

Einfluss des Immunsystems auf die Frakturheilung in der Maus

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades

d o c t o r r e r u m n a t u r a l i u m

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Diplom-Biologin Ireen Könnecke geb. Schröder

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Jan-Hendrik Olbertz

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Prof. Dr. Andreas Herrmann

Gutachter: 1. Prof. Dr. Georg Duda
 2. Prof. Dr. Andreas Radbruch
 3. Prof. Dr. Britt Wildemann

Tag der mündlichen Prüfung: 30.08.2012

Meiner Familie

Zusammenfassung

Noch immer gibt es trotz neuester medizinischer Operationstechniken Patienten, bei denen eine Fraktur zu einer verzögerten Heilung führt oder gar nicht heilt. Auch Patienten mit HIV, Osteoporose oder Rheumatoider Arthritis zeigen eine schlechte Frakturheilung, die oft sehr viel länger dauert. Indizien häufen sich, dass das Immunsystem, seine Zellen und Zytokine eine wichtige Rolle im Prozess der Heilung einer Fraktur spielen könnten.

Daher wurde in dieser Arbeit der Einfluss des adaptiven Immunsystems auf die Frakturheilung untersucht. Dazu wurde der Heilungsverlauf in Wildtyp Mäusen mit $RAG1^{-/-}$ Mäusen, Mäusen ohne reife B- und T-Lymphozyten, verglichen. Die histologischen Untersuchungen zeigten, dass in der Mutante der Heilungsprozess beschleunigt schien, in dem die Knorpelphase schneller beendet war und die Knochenbildung früher begann. Bei der Untersuchung der Verteilung der Kollagene im Kallus beider Versuchsgruppen stellte sich heraus, dass diese in der Mutante verändert waren und Kollagene zumeist nur sehr weit von der Fraktur entfernt detektiert werden konnten. Die verkürzte Knorpelphase resultierte in einer zeitlich verkürzten Ablagerung von Kollagen I und führte zu einer Geflechtknochenbildung, die diffus über den ganzen Kallus verteilt war. Bestätigt wurden die Ergebnisse durch Microarray Analysen, die zeigten, dass in der Mutante die Expression der Kollagene kaum reguliert wurde, während im Wildtyp an Tag 3 und 7 nach der Fraktur die Kollagen-Expression herunter reguliert wurde. Die Ergebnisse der Zellkulturexperimente zeigten, dass die von Kossa gefärbte Matrix der differenzierten Zellen anders verteilt war. Bei den Zellen des Wildtyps kam es zu einer regelmäßigen Anfärbung der kompletten Versuchsoberfläche, während bei den Zellen der Mutante die angefärbten Bereiche zwar stärker erschienen, aber unregelmäßig verteilt waren. In einzelnen knock out Tieren für B- (JHT-Tiere) oder T-Lymphozyten ($\beta\delta$ - knock out Tiere) wurde anschließend festgestellt, dass es ohne T-Lymphozyten an Tag 7 ein ähnliches Heilungsergebnis gab wie in den $RAG1^{-/-}$ Tieren. Fehlten hingegen die B-Lymphozyten ähnelte es eher den Wildtypen und zeigte weniger Knochen und mehr Knorpel als die $RAG1^{-/-}$ Tiere. Dies lässt den Schluss zu, dass T-Lymphozyten einerseits der Schlüssel für ein gutes Heilungsergebnis sind, andererseits ihr Fehlen maßgeblich zu einer Veränderung der Heilung führt. Diese resultierte darin, dass die Knorpelphase verkürzt war und eine ungeordnete Bildung von Geflechtknochen einsetzte. Ziel folgender Studien sollte es daher sein, eine T-Lymphozyten Subpopulation zu identifizieren, die für einen geordneten Heilungsverlauf notwendig ist und diese in Patienten mit schlechter Heilung zu stimulieren.

Abstract

Despite of advanced methods in trauma surgery some patients suffer from a delayed healing or a non-union one. Especially patients with HIV, osteoporosis or rheumatoid arthritis show delayed healing outcomes. There is more and more evidence that the immune system with its cells and mediators could play an important role in such healing situations.

Hence this thesis investigated the role of the adaptive immune system in the process of fracture healing comparing healing in wildtype mice and RAG1^{-/-} mice. RAG1^{-/-} mice do not have mature B- and T-lymphocytes. Histological examination revealed a shorter phase in which chondrocytes were present in the callus area and an earlier onset of bone formation. Thus the healing process seemed to be faster. But experiments regarding collagen content and distribution in both groups showed changes in the mutant animals. Collagen was only found far from the fracture gap. The shortened cartilage phase conducted a shorter period in which collagen I was secreted and therefore the distribution of woven bone was diffuse. The results were confirmed by microarray analyses in which collagen of the RAG1^{-/-} animals showed almost no regulation whereas collagen was down regulated on the 3rd and 7th day post fracture in the wildtype. Cell culture experiments with mesenchymal stem cells showed also differences between both groups. Von Kossa staining was different in the mutant mice. Wildtype animals demonstrated a regular distribution of the staining in the whole area which was investigated whereas the mutant showed stronger staining but irregular distributed.

Additionally single knock out animals either without B- (JHT mice) or T-lymphocytes ($\beta\delta$ -knockout mice) were determined. Without T lymphocytes fracture healing showed almost the same healing than in the RAG1^{-/-} mice. However when of B lymphocytes were missing healing was the same like in wildtype. For this reason it could be concluded that T lymphocytes are the key cell for a normal healing outcome. Their absence leads to a different healing outcome with a diminished cartilage phase and an irregular distribution of woven bone in the whole callus region.

The overall goal should be the identification of one T cell subset which causes the positive effect in the process of fracture healing and stimulate it in patient who suffer from a delayed healing or non-union.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	III
Abstract.....	IV
Inhaltsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis.....	V
Tabellenverzeichnis.....	IX
Abkürzungsverzeichnis.....	X
1 Einleitung	1
1.1 Der Knochen.....	1
1.1.1 Aufbau des Knochens.....	1
1.1.2 Knochenstoffwechsel.....	3
1.1.3 Frakturheilung	7
1.2 Das Immunsystem	9
1.2.1 Das erworbene Immunsystem	10
1.2.2 Die RAG1 ^{-/-} Maus als Modell.....	12
1.3 Osteoimmunologie	16
1.3.1 Interaktion zwischen Knochen- und Immunsystem	16
1.4 Zielsetzung und Hypothese	21
2 Material und Methoden	22
2.1 Versuchstiere zur Untersuchung der Frakturheilung.....	22
2.1.1 Haltung und Fütterung.....	22
2.1.2 Studiendesign.....	22
2.2 Operationsmethode.....	23
2.3 Histologische Analyse.....	25
2.3.1 Gewebeaufbereitung zur Herstellung der Schnitte.....	25
2.3.2 Movat Pentachrom Färbung zur Darstellung der einzelnen Gewebe	29
2.3.3 TRAP – Färbung zur Darstellung von Osteoklasten	31
2.3.4 Van-Gieson/Von Kossa Osteoid Färbung	32

Inhaltsverzeichnis

2.3.5	Alcianblau-Färbung für den spezifischen Knorpelnachweis.....	33
2.3.6	Von Kossa/ Safranin-O-Färbung zur Darstellung von Knochen und Knorpel.	34
2.3.7	Deskriptive Analyse-Beschreibung der Heilung in einzelnen Versuchstieren.	34
2.3.8	Histomorphometrie zur Quantifizierung der Gewebeanteile.....	35
2.4	Immunhistologische Untersuchungen	36
2.4.1	Prinzip des immunhistologischen Färbung.....	36
2.5	Immunofluoreszenz	39
2.5.1	<i>In vivo</i> Fluorochrommarkierung zur Detektion der Dynamik zwischen Knochenbau und Resorption	39
2.5.2	mehrfach Antigenmarkierung zur Identifizierung spezifischer Zellen und ihrer Lage zueinander.....	39
2.6	Durchflusszytometrie zur Validierung des Tiermodells.....	41
2.6.1	Gewinnung der Proben aus Milz, Blut und Knochenmark.....	41
2.6.2	Aufarbeitung der Zellen.....	41
2.6.3	Färbung der Zellen.....	42
2.6.4	Auswertung der Daten	42
2.7	Molekularbiologische Analyse.....	43
2.7.1	qRT-PCR zur Bestimmung der Expression spezifischer Gene	43
	Auswertung	45
2.7.2	Transkriptomanalyse für globale Genexpression in den Versuchstieren im Heilungsverlauf	45
2.8	Zellbiologische Untersuchungen- Analyse der Differenzierungskapazität der MSCs.	46
2.8.1	Gewinnung der Mesenchymalen Stromazellen (MSCs)	46
2.8.2	Kultivierung der MSCs.....	47
2.8.3	Osteogener Differenzierungsassay	47
2.9	Statistik.....	49
3	Ergebnisse	51
3.1	Charakterisierung von Knochenmark, Milz und Blut in WT und RAG1 ^{-/-} Mäusen zur Validierung des Mausmodells	51
3.2	Histologische Analyse.....	58
3.2.1	In der deskriptiven Analyse zeigte sich eine frühere Verknöcherung der Chondrozyten in der Mutante	58
3.2.2	Die histomorphometrischen Untersuchungen zeigten zu jedem Zeitpunkt der Frakturheilung mehr Knorpel in den WT Tieren.....	64

3.2.3	Der Frakturkallus der WT Tiere wies weniger Osteoklasten auf	67
3.2.4	Die Osteoidquantifikation zeigte keine Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen	69
3.3	Immunhistologische Untersuchungen	70
3.3.1	Veränderte Kollagenlokalisationen in beiden Versuchstiergruppen	70
3.3.2	Kaum veränderte Osteoblastenzahlen im WT	73
3.3.3	Faktor VIII Färbung.....	75
3.4	Immunofluoreszenz	76
3.4.1	In den RAG1 ^{-/-} Tieren wurde früher im Heilungsprozess Knochen gebildet... ..	76
3.4.2	Nachweis spezifischer Immun- und Knochenzellen	81
3.5	Molekularbiologische Untersuchungen.....	90
3.5.1	Unterschiede in der Expression von Kollagen I und X zwischen den Versuchsgruppen	90
3.5.2	Kaum Veränderungen der Expression der Kollagene in der Mutante.....	91
3.6	Zellbiologische Differenzierung.....	96
3.6.1	Die MSCs des Wildtypstamms bildeten weniger Filopodien aus und besaßen schlankere Zellkörper	96
3.6.2	Diffusere Ablagerung von Kalzium-Ionen in den osteogen differenzierten Zellen der RAG1 ^{-/-} Tiere	96
3.7	Untersuchung weiterer Knock-out Tiere.....	100
3.7.1	Beta-delta knock-out Tiere zeigten an Tag 7 einen ähnlichen Heilungsstatus wie die RAG1 ^{-/-} Tiere	100
3.7.2	JHT knock-out Tiere ähneln im Heilungsstatus den Wildtyp Tieren	102
4	Diskussion.....	105
4.1	Der Einfluss der Immunzellen auf den Knochenmetabolismus	106
4.2	Osteoblasten- und Osteoklastenzahlen zeigten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen	108
4.3	Lymphozytendefizienz beeinflusst die enchondrale Ossifikation.....	110
4.4	Inflammation und Frakturheilung.....	114
4.5	Die Frakturheilung in JHT ^{-/-} und $\beta\delta$ ^{-/-} Tieren an Tag 7	118
4.6	Ausblick.....	123

5 Literaturverzeichnis	125
6 Anhang.....	137
6.1 Danksagungen	137
6.2 Veröffentlichungen und Kongressbeiträge.....	138
6.3 Eidesstattliche Erklärung.....	140

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Zeichnung eines Ausschnitts der Substantia compacta.	2
Abb. 2: Darstellung der Differenzierung, Aktivierung und Inhibierung der Osteoklasten.	5
Abb. 3: Schematische Darstellung der Kopplung zwischen Knochenabbau und Knochenaufbau.	6
Abb. 4: Die 4 Phasen der Frakturheilung	7
Abb. 5: Übersicht über die Bestandteile des Immunsystems	9
Abb. 6: Genloci der V-, D- und J-Regionen	13
Abb. 7: Übersicht über den Rekombinationsprozess.	14
Abb. 8: Zusammenfassung der Interaktion zwischen Osteoblasten, Osteoklasten und den Lymphozyten	18
Abb. 9: Übersicht der Knochenresorption durch Osteoblasten und aktivierte B- und T-Lymphozyten	19
Abb. 10: Übersicht über die einzelnen Schritte der OP	24
Abb. 11: FACS Analyse des Knochenmarks im WT.	51
Abb. 12: FACS Analyse des Knochenmarks im RAG1 ^{-/-} Tier.	52
Abb. 13: FACS Analyse des Bluts und der Milz im RAG1 ^{-/-} Tier.	53
Abb. 14: Färbung der B-Lymphozyten im Wildtyp Tier.	54
Abb. 15: Darstellung der T-Lymphozyten im WT und im RAG1 ^{-/-} Tier	55
Abb. 16: Anfärbung der Schnitte mit Osteokalzin, B220, CD3	56
Abb. 17: Osteoklastenfärbung im WT und im RAG1 ^{-/-}	57
Abb. 18: Geflechtknochenbildung an den Kortizes	59

Abbildungsverzeichnis

Abb. 19: Chondrozyten im Kallus.....	60
Abb. 20: Übersicht über die im Kallus vorliegenden Gewebeanteile im WT.....	61
Abb. 21: Repräsentative Darstellung der Frakturkallus an Tag 14	62
Abb. 22: Kallus an Tag 14.....	62
Abb. 23: Darstellung der Kallus am Tag 21 der Frakturheilung im WT.....	63
Abb. 24: Übersicht über den Heilungsverlauf:.....	64
Abb. 25: Anteil des verknöcherten Gewebes am Gesamtkallus.....	65
Abb. 26: Übersicht des Knorpelanteils am Gesamtkallus.....	67
Abb. 27: Repräsentative Darstellung der Osteoklasten in WT und RAG1 ^{-/-} Tieren	67
Abb. 28: Graphische Darstellung der Osteoklastenzahlen pro mm ²	68
Abb. 29: Darstellung der Auswertung der Osteoidfärbung.....	69
Abb. 30: Unterschiede in der Osteoidmenge zwischen dem WT und der Mutante	70
Abb. 31: Kollagen I Färbung des WT und im RAG1 ^{-/-}	71
Abb. 32: Darstellung der Kollagen II Färbung im WT und RAG1 ^{-/-}	72
Abb. 33: Kollagen X Färbung des Kallus im WT und in der Mutante	73
Abb. 34: Osteokalzin-Färbung im WT und RAG1 ^{-/-}	74
Abb. 35: Darstellung der Ergebnisse der Osteoblastenanalyse.....	74
Abb. 36: Vergleich des neugebildeten Knochens zwischen Tag 5 und 7	76
Abb. 37: Einlagerung der Fluorochrome nach 14 Tagen im WT	77
Abb. 38: Fluorochromeinlagerung in den RAG1 ^{-/-} Tieren	78
Abb. 39: <i>In vivo</i> Fluoreszenzmarkierung 21 Tage nach der Fraktur	79
Abb. 40: Dynamik von Knochenneubildung und –Resorption in den RAG1 ^{-/-} Tieren.....	80

Abbildungsverzeichnis

Abb. 41: Nachweis der B-Lymphozyten im Kallus an Tag 7.....	81
Abb. 42: Frakturkallus 14 Tage post Fraktur	82
Abb. 43: Nachweis der T-Lymphozyten im WT an Tag 7.....	83
Abb. 44: Tag 14 nach Setzen der Fraktur	84
Abb. 45: Verteilung der Lymphozyten und des Lamininnetzwerks in den RAG1 ^{-/-} Tieren	84
Abb. 46: Nachweis von Osteoklasten und Makrophagen im WT	85
Abb. 47: Nachweis der Osteoklasten im WT an Tag 14	86
Abb. 48: Nachweis der Osteoklasten in den RAG1 ^{-/-} Tieren	86
Abb. 49: Nachweis der Osteoklasten in den RAG1 ^{-/-} Tieren an Tag 14.....	87
Abb. 50: Nachweis von Osteoblasten im WT	88
Abb. 51: Nachweis der Ostoblasten im WT an Tag 14	88
Abb. 52: Nachweis der Osteoblasten an Tag 21 im WT	89
Abb. 53: Nachweis der Osteoblasten in den RAG1 ^{-/-} Tieren an Tag 14 im Kallus	89
Abb. 54: Nachweis der Osteoblasten am Tag 21 in der Mutante; Osteokalzin, B220, CD3, eosinophile Granulozyten.....	90
Abb. 55: QRT-PCR der Gene Kollagen I, Kollagen X und OPG	91
Abb. 56: Teil 1 der Heatmap mit der Genexpression	92
Abb. 57: Teil 2 der Heatmap mit der Genexpression	93
Abb. 58: Morphologische Charakterisierung der MSCs im WT und im RAG1 ^{-/-}	96
Abb. 59: Übersicht der Von Kossa Färbung an Tag 16 der Differenzierung.....	97
Abb. 60: Übersicht der Von Kossa Färbung an Tag 21 der Differenzierung.....	98
Abb. 61: Übersicht über die Alizarin Rot S Färbung an Tag 16 im WT	98

Abbildungsverzeichnis

Abb. 62: Übersicht der Alizarin Rot S-Färbung in der Mutante	99
Abb. 63: Übersicht über die Alizarin Rot S-Färbung an Tag 21 der Differenzierung im WT und der Mutante.	99
Abb. 64: Übersicht der angefertigten Färbungen des Frakturkallus 7 Tage nach der Fraktur.	101
Abb. 65: Graphische Darstellung der histomorphometrischen Auswertung.....	102
Abb. 66: Färbung des Frakturkallus mit Movat Pentachrom, Alcianblau und Safranin O/Von Kossa	103
Abb. 67: Graphische Darstellung der histomorphometrischen Analyse	104
Abb. 68: Darstellung der 4 Phasen der Frakturheilung.....	121
Abb. 69: Frakturheilung	122

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Selektion relevanter Zytokine und ihr Einfluss auf Osteoblasten und Osteoklasten ...	17
Tab. 2: Versuchsgruppen	23
Tab. 3: Schema der Entwässerung.....	26
Tab. 4: Entwässerungsschema für die Plastikeinbettung	27
Tab. 5: Übersicht über die genutzten Antikörper	40
Tab. 6: Auflistung der für die FACS-Färbung genutzten Antikörper	42
Tab. 7: Primersequenzliste	44
Tab. 8: Anteil des verknöcherten Gewebes am Gesamtkallus.....	66
Tab. 9: Zusammenfassung des Knorpelanteils.	66
Tab. 10: Zusammenfassung der absoluten Osteoklastenzahlen	68
Tab. 11: Mittelwerte der Vermessung des Osteoids	70
Tab. 12: Zusammenfassung der relativen Zahlen aus der Analyse der Osteoklazin- Färbung	75
Tab. 13: Zusammenfassung der Ergebnisse der Faktor VIII Färbung.....	75
Tab. 14: Zusammenfassung der neugebildeten Knochens	77
Tab. 15: Zusammenfassung der absoluten Werte der Knochenneubildung an Tag 14 post Fraktur.	78
Tab. 16: Zusammenfassung der Auswertung der <i>in vivo</i> Fluorochrommarkierung	80

Abkürzungsverzeichnis

A 647	Alexa Fluor 647
Abb.	Abbildung
a. dest	Aqua destillatum
AK	Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
APC	Antigenpräsentierende Zelle
Ar	Gesamtkallusfläche
BCR	B-Zell-Rezeptor
Bglap-rs1	bone gamma-carboxyglutamat protein, related sequence 1
BMP	bone morphogenetic protein
BMD	Knochenmineraldichte
BMU	multizelluläre Knocheneinheit
CD	Cluster of Differentiation
Cg	Knorpelgewebe
Col	Kollagen
Crtap	cartilage associated protein
Cy 5	Cyannine 5
D	Diversity oder Tag
DAPI	4',6'-Diamidino-2-Phenylindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DN	doppelt negativ
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DP	doppelt positiv
ds	doppelsträngig
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtOH	Ethanol
FACS	fluorescence activated cell sorting
FCS	fötales Kälberserum
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
GAPDH	Glyeraldehyd-3-phosphat Dehydrogenase
GM-CSF	granulocyte macrophage colony-stimulating factor
HAc	Essigsäure
HCl	Chlorwasserstoff
HSC	Hämatopoetische Stammzelle
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
INF- γ	Interferon gamma
J	Joining

Abkürzungsverzeichnis

Klf	erythroid Kruppel-like factor
KO	knock-out
Max	Maximum
M-CSF	macrophage colony-stimulating factor
µm	Mikrometer
mm	Millimeter
Mmp	matrix metalloproteinase
Min	Minimum
MSC	Mesenchymale Stromazelle
MW	Mittelwert
NK	Natürliche Killerzelle
ObN	Osteoblastenzahl
OC	Osteoklast
OcN	Osteoklastenzahl
OP	Operation
OPG	Osteoprotegerin
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin Chlorophyll-a Protein
PFA	Paraformaldehyd
PMMA	Polymethylmethacrylat
Prf	Perforin
P/S	Penicillin/Streptavidin
PWS	Phosphorwolframsäure
qRT	quantitative reverse Transkriptase
RAG	recombination activating gene
RANK	receptor activator of nuclear factor kappaB
RANKL	receptor activator of nuclear factor kappaB ligand
RNA	Ribonukleinsäure
ROI	Region of Interest
rpm	Umdrehung pro Minute
RSS	Rekombinationssignalsequenz
RT	Raumtemperatur
Runx2	runt-related transcription factor 2
SCID	severe combined immunodeficiency
Sox	Sry-related HMG box
SP	single positiv
Tab.	Tabelle
TBS	Tris gepufferte Salzlösung
TCR	T-Zell-Rezeptor
TGF-β	transforming growth factor beta

Abkürzungsverzeichnis

TNF- β	Tumornekrosefaktor beta
TOT	mineralisiertes Gewebe
TRAP	Tartrat resistente saure Phosphatase
TWEEN	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
V	variable
VpreB	pre-B-lymphocyte
WT	Wildtyp

1 Einleitung

Trotz fortschrittlicher Operationsmethoden zeigen 10-20% aller auftretenden Frakturen eine verzögerte Heilung oder sogar eine Nichtheilung¹. Die heutzutage häufigsten Therapien sind die chirurgische Behandlung eines Knochendefekts mit einer Transplantation von autologem Knochen oder die Implantation osteokonduktiver Materialien oder osteoinduktiver Faktoren. Doch die operative Versorgung ist nicht immer erfolgreich und auch generelle Operationsrisiken müssen bedacht werden. Beispielsweise kommt es in 10-39% der Beckenkammtransplantate auf der Spenderseite zu persistierenden Schmerzen^{2,3}. Es ist denkbar, dass in einigen dieser Fälle der Nichtheilung auch das Immunsystem eine Rolle spielt, da der Knochen nicht nur die statische Stütze des Körpers ist, sondern auch der Ort an dem Stammzellen zu roten Blutzellen und Lymphozyten heranreifen. Das Forschungsgebiet der Osteoimmunologie befasst sich seit einigen Jahren mit diesen möglichen Interaktionen. Unklar ist jedoch noch immer, welchen Einfluss Immunzellen auf den Knochen während der Frakturheilung besitzen, denn während des komplexen Prozesses der Frakturheilung ist ein geordnetes Zusammenspiel verschiedener Zelltypen und ihrer regulatorischen Moleküle erforderlich⁴.

1.1 Der Knochen

1.1.1 Aufbau des Knochens

Der Knochen ist ein dynamisches Organ, welches im Gegensatz zu anderen Organen des Körpers ständig signifikanten Veränderungen unterliegt⁵. Er besitzt die einzigartige Fähigkeit sich zu regenerieren und ist in der Lage mechanische und metabolische Reize in eine Antwort zu verwandeln. Die Regenerationsprozesse des Knochens ermöglichen eine ständige Erneuerung und Anpassung des Gewebes an die jeweilige Situation und stellen darüberhinaus eine optimale Voraussetzung für eine narbenfreie Heilung dar⁶. Damit sorgt das Knochengewebe für eine strukturelle Integrität des Körpers, ist gleichzeitig der Ort der Hämatopoese und dient als Lagerstätte für Kalzium und Phosphat⁷.

Morphologisch liegt der Knochen in drei verschiedenen Formen vor. Dazu gehören lange Röhrenknochen wie Humerus, Tibia und Femur, kurze Knochen und platte Knochen. Die langen Röhrenknochen bestehen aus einer länglichen, schaftförmigen Diaphyse, die in der

Knochenmitte sitzt und einen einheitlichen Markraum mit Knochenmark besitzt, den beiden Knochenenden, den Epiphysen, welche ein Geflecht von Knochenbälkchen enthalten und den Metaphysen, die zwischen Epiphyse und Diaphyse liegen und aus schwammiger Knochen- substanz bestehen.

Histologisch betrachtet besteht jeder Knochen aus einer äußeren Schicht kortikalen Knochens (Substantia compacta) und einer inneren Schicht trabekulären Knochens. Dabei weist der kortikale Knochen im Gegensatz zum trabekulären Knochen eine dichte und geordnete Struktur auf. Der trabekuläre Knochen ist hingegen weniger kompakt, besitzt eine irreguläre Struktur und ist verantwortlich für die Kalzium- und Phosphathomöostase. Im Menschen setzt sich der Knochen aus dem „Haverschen System“ (Abb. 1) zusammen, bei dem dicke Knochenlamellen konzentrisch um einen Zentralkanal vorliegen. In diesem Zentralkanal verlaufen Blutgefäße, die über seitliche Verzweigungen miteinander verbunden sind. Neben diesen Gefäßen befinden sich im Havers-Kanal Bindegewebe und vegetative Nervenfasern. Blutgefäße sind dabei für die Nährstoffversorgung des Knochens zuständig⁸.

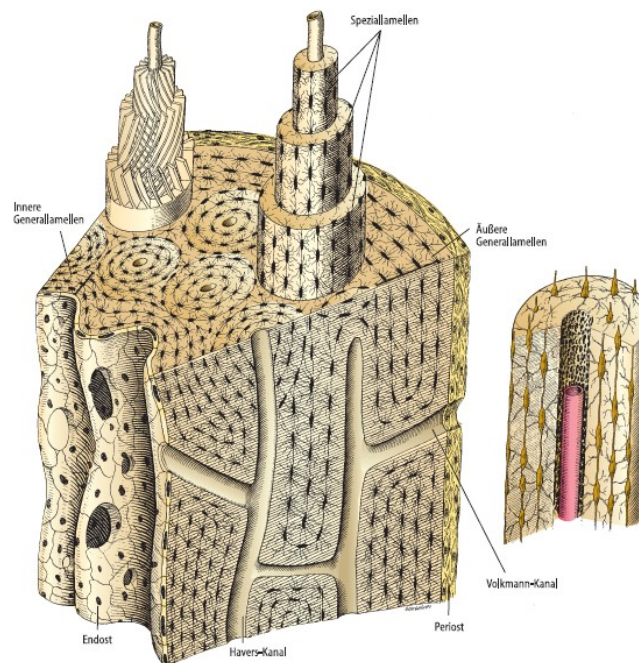


Abb. 1: Zeichnung eines Ausschnitts der Substantia compacta der Diaphyse eines Röhrenknochens. Die Osteone sind aus Lamellen aufgebaut, dazwischen sind Schaltlamellen. Die äußeren Lamellen grenzen an das Periost, die inneren an das Endost. Oben links ist der scheringitterartige Verlauf der Kollagenfasern in den Lamellen des Osteons dargestellt. Rechts ist ein Osteon bei stärkerer Vergrößerung dargestellt, sodass die Osteozyten und das zentrale Blutgefäß sichtbar werden (übernommen aus Junqueira LCU, 2005⁸).

Im Gegensatz zum Menschen besitzt die Maus eine primitive Knochenstruktur ohne „Haversches System“.

Auf dem kortikalen Knochen befindet sich eine weitere Membran, das Periost. Dieses Periost besteht aus einer fibrösen Schicht und einer Schicht mit osteogenem Potential aus der der neue Knochen entsteht. Der innere Bereich des Kortex ist mit Endost ausgekleidet. Sowohl im Periost als auch im Endost befinden sich Osteoblasten, Osteoklasten und deren Vorläuferzellen. Von hier aus koordinieren sie Knochenumbau, Remodeling und Reparatur⁹.

Es können zwei Arten von Knochengewebe unterschieden werden, dazu zählen Geflechtknochen und Lamellenknochen. Das Wachstum des Geflechtknochens erfolgt mit unregelmäßig verlaufenden Kollagenfasern entlang der Kapillaren. Der Lamellenknochen hingegen zeigt ausgeprägte Strukturen, die parallel zu mechanischen Belastungslinien zu verlaufen scheinen⁸.

Die Knochengrundsubstanz besteht zu 65% aus anorganischen und 35% aus organischen Komponenten⁸, wobei die organische Knochensubstanz zu 95% aus Typ I Kollagen und zu 5% aus Proteoglykanen und nicht kollagenen Proteinen zusammengesetzt ist. Zu den zellulären Bestandteilen des Knochens zählen Osteoblasten, Osteozyten und Osteoklasten⁹.

1.1.2 Knochenstoffwechsel

Bei Knochen handelt es sich um eine spezielle Form des Bindegewebes und obwohl es metabolisch inaktiv scheint, werden etwa 10% des gesamten Knochengewebes jedes Jahr restrukturiert. Dabei ist der Umbau (Remodeling) abhängig von der dynamischen Balance zwischen Knochenaufbau und Knochenresorption. Eine feine Regulation dieser Prozesse ist essentiell für die Knochenhomöostase. Ein Ungleichgewicht kann schnell zu einer Osteoporose oder einem entzündlich bedingten Knochenverlust führen¹⁰. Auf zellulärer Ebene sind für das Remodeling vier verschiedene Zelltypen erforderlich, Chondrozyten, Osteoblasten, Osteozyten und Osteoklasten¹¹.

Bei den Osteoblasten handelt es sich um Zellen mesenchymalen Ursprungs, die neuen Knochen produzieren und die Matrix mineralisieren¹². Dabei erfolgt der Knochenaufbau in fünf Schritten. Zuerst erfolgt die Proliferation der mesenchymalen Zellen, diese differenzieren

zu osteoblastären Vorläufern und reifen schließlich zu Osteoblasten heran. Die reifen Osteoblasten synthetisieren eine Matrix, die sie im letzten Schritt mineralisieren¹³. Proliferation und Differenzierung unterliegen vielen löslichen Faktoren wie beispielsweise Runx2 (runt-related transcription factor 2) und Osterix¹¹. Zuerst synthetisieren die Osteoblasten neue Kollagenfibrillen ungeordnet auf der verbliebenen Knochenoberfläche. Ist ein neues Kollagengerüst entstanden, werden mehr Osteoblasten rekrutiert und stellen sich polarisiert auf dem Geflechtknochen auf. Die von ihnen synthetisierten Kollagenfibrillen sind nun parallel orientiert und bilden den neuen Lamellenknochen¹⁴. Wenn die Osteoblasten nicht mehr gebraucht werden, verlieren sie ihre Synthesekapazität und werden ruhende knochenbedeckende Zellen oder in die selbst synthetisierte Matrix eingemauerte Osteozyten. Die eingelagerten Osteozyten produzieren Sclerostin, ein Protein welches die Osteoblasten inhibiert¹³.

Der Osteoklast ist im Gegensatz zum Osteoblasten hämatopoetischen Ursprungs und als dessen Gegenspieler verantwortlich für die Resorption des Knochens. Beim Osteoklasten handelt es sich um eine multinukleäre Zelle¹⁵, die eine charakteristische Struktur, die sogenannte „ruffled border“ besitzt. Diese entsteht, wenn der Osteoklast sich auf einer zu resorbierenden Fläche angeheftet hat und sein Aktinzytoskelett umordnet, um die Region fest zu umschließen. Anschließend produziert der Osteoklast Chlorwasserstoff (HCl) und sorgt so für eine Azidifizierung der Knochenoberfläche. Durch die Ansäuerung wird die organische Matrix demineralisiert und durch Kathepsin K abgebaut¹⁶.

Knochenaufbau und –resorption unterliegen einer Kopplung. Diese wird über die Expression und Sekretion von RANKL (receptor activator of nuclear factor κ B ligand) und OPG (Osteoprotegerin) der Osteoblasten reguliert (Abb. 2). Diese sind in der Lage mit Hilfe von RANKL osteoklastäre Vorläuferzellen der hämatopoetischen Linie zur Differenzierung anzuregen. Dabei kommt es zunächst zur Bildung eines Prä-Osteoklasten. Die weitere Stimulation durch RANKL führt zu einer Verschmelzung mehrerer Prä-Osteoklasten zu mehrkernigen reifen knochen-resorbierenden Zellen und schließlich zur Aktivierung dieser. Der Prozess der Differenzierung und Aktivierung der Osteoklasten kann durch die Sekretion von OPG durch Osteoblasten auch inhibiert werden. Dabei bindet OPG an RANKL und verhindert dessen Bindung an RANK auf den Osteoklasten. Der Osteoblast ist somit ein wichtiger Regulator der

Osteoklasten und für das Gleichgewicht zwischen Knochenaufbau und Resorption mit verantwortlich.

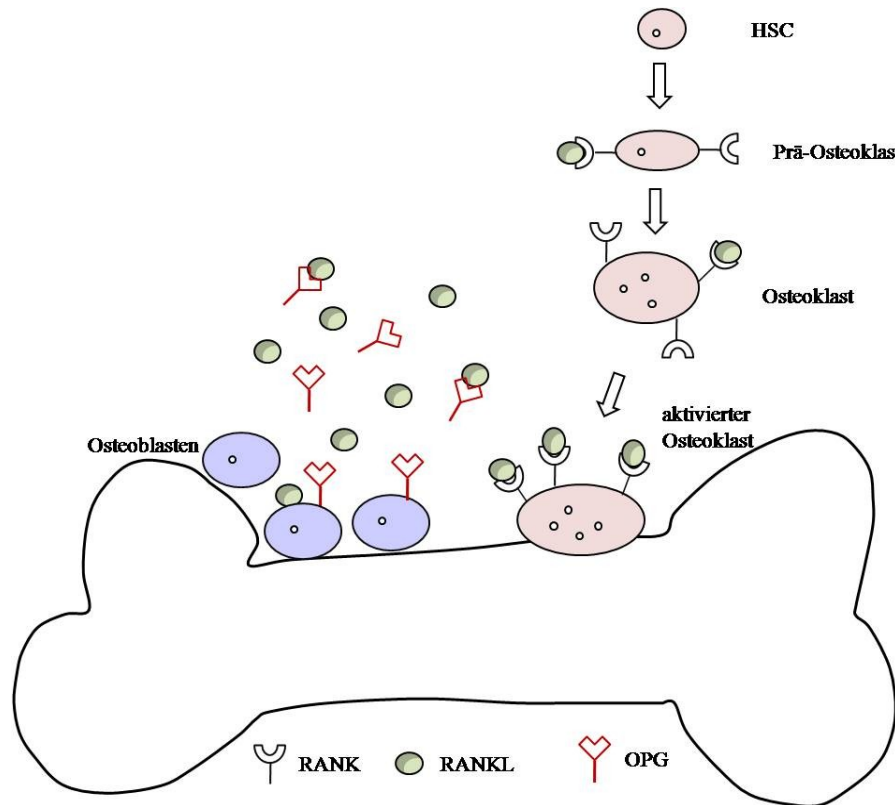


Abb. 2: Darstellung der Differenzierung, Aktivierung und Inhibierung der Osteoklasten durch die knochenbildenden Osteoblasten. Osteoblasten stimulieren durch die Expression von RANKL die Differenzierung osteoklastärer Vorläufer. Diese entwickeln sich anschließend zu reifen Osteoklasten und werden wiederum über RANKL aktiviert. Dieser Prozess kann durch OPG von Osteoblasten inhibiert werden. Dabei wirkt OPG antagonistisch zu RANK.

Um die dynamische Balance des Remodelings zu erhalten, gibt es im Menschen etwa 1-2 Millionen mikroskopisch kleine Remodelingbereiche (Abb. 3), die als einfache multizelluläre Einheiten (BMUs) bezeichnet werden. Dabei dauert die Resorption durch die Osteoklasten etwa drei Wochen, während die Zeit für das Wiederauffüllen mit neuer Knochenmatrix durch die Osteoblasten drei bis vier Monate braucht^{13,17}. Der Aufbau trabekulären Knochens erfolgt dabei schneller als der von kortikalem Knochen. Entscheidend für die Entstehung einer BMU ist das Alter des Knochens¹⁸.

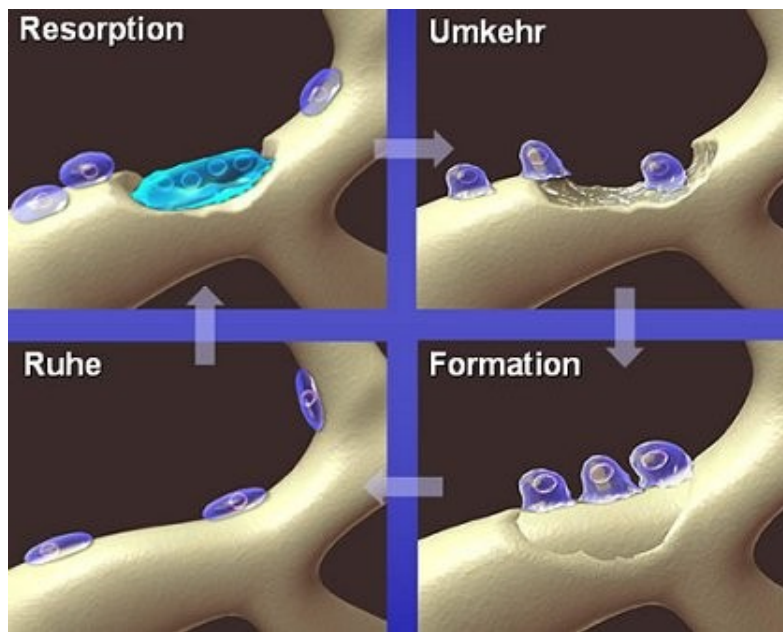


Abb. 3: Schematische Darstellung der Kopplung zwischen Knochenabbau und Knochenaufbau. Zuerst lagert sich der Osteoklast an den Knochen an und resorbiert die Knochenmatrix. In der Nähe befinden sich Osteoblasten, die auf ihr Aktivierungssignal warten und neuen Knochen aufbauen, sobald dieses Signal erfolgt, nehmen die Osteoblasten eine palisadenartige Struktur an und bilden eine neue Knochenmatrix. Anschließend werden sie zu „bone lining“ Zellen. (<http://www.novartis-oncology.ch/platform/content/element/3607/knochenumbau.jpg>)

Die Initiation des Prozesses erfolgt über mechanische Belastung, eine Gewebeerstörung oder Zytokinsignale, die zu einer lokalen Reaktion führen^{19,20} oder aber durch die Expression von RANKL (receptor activator of nuclear factor κ B ligand) durch Osteoblasten²¹. *In vivo* ist noch nicht geklärt, wie die Resorption durch Osteoklasten beendet wird. *In vitro* hingegen lassen Untersuchungen vermuten, dass Osteoklasten während der Resorption Osteozyten phagozytieren und so das Signal bekommen, die Resorption zu beenden²², aber auch das Vorhandensein von TGF- β (transforming growth factor)²³ oder Östrogenen²⁴ könnte in Osteoklasten eine Apoptose auslösen. Zum Ende der Resorption erscheinen mononukleäre Zellen an den Resorptionslakunen und bereiten die Lakune für die Osteoblasten vor. Dabei handelt es sich meist um Makrophagen, die eine sehr dünne Schicht Kollagen mit sehr viel enthaltenem Osteopontin synthetisieren²⁵. Osteopontin ermöglicht dann die Anlagerung der Osteoblasten und wirkt als Signalgeber für diese²⁶.

1.1.3 Frakturheilung

Der Komplex der Knochenregeneration beinhaltet eine gut abgestimmte Abfolge biologischer Ereignisse, die in einem definierten zeitlichen und räumlichen Rahmen von statten gehen²⁷. Der Prozess ist charakterisiert durch Matrixsynthese und Resorption, sowie von Revaskularisierung und der Bildung von Geflecht- und Lamellenknochen⁴. Man unterscheidet zwei Arten der Frakturheilung, die primäre und die sekundäre Frakturheilung. Bei der primären Frakturheilung kommt es zu einem Zusammenwachsen der Frakturenenden ohne die Bildung eines Frakturkallus'. Voraussetzung für diese Art der Heilung ist die mechanische Stabilität der Fraktur und eine spaltfreie Aneinanderlagerung der Frakturenenden.

Die häufigste Heilungsform ist die der sekundären Frakturheilung. Dieser Prozess der Frakturheilung umfasst 4 Phasen (Abb. 4).

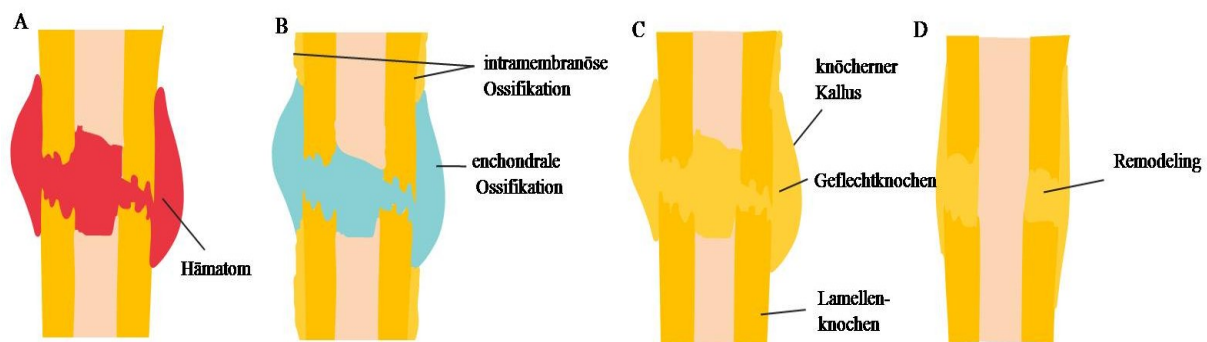


Abb. 4: Die 4 Phasen der Frakturheilung. A) Bildung des Hämatoms nach der Verletzung und der Zerstörung der Gefäße, B) Phase der Reparatur mit der Bildung von Knorpel, der beginnenden Revaskularisierung und der intramembranösen Ossifikation. Der Knorpel reift in dieser Phase heran und verknöchert. Anschließend wird der Knorpel abgebaut und durch Geflechtknochen ersetzt. C) Phase des knöchernen Kallus in der kein Knorpel im Kallus vorkommt. D) Remodelling, bei dem der Geflechtknochen durch Lamellenknochen ersetzt wird und der Knochen seine Ausgangsstruktur wieder annimmt.

Inflammation

In Folge der Fraktur kommt es zur Zerstörung der Gefäße, zu einer Aktivierung der Koagulationskaskade und zur Bildung eines Hämatoms²⁸. Degranulierende Zellen wie Makrophagen, Lymphozyten und Monozyten infiltrieren das Hämatom und sekretieren Zytokine und Wachstumsfaktoren. Damit initiieren Immunzellen und ihre Mediatoren die Heilungskaskade²⁹ und sorgen für die Rekrutierung weiterer inflammatorischer Zellen und Zellvorläufer³⁰. Sekretierte proangiogene Faktoren stimulieren die Angiogenese und die Entstehung neuer Gefäße³¹.

Phase der Reparatur

Frakturen weisen in den meisten Fällen Fragmentbewegungen auf und heilen daher über den Prozess der sekundären Frakturheilung. Dieser besteht sowohl aus enchondraler als auch aus intramembranöser Ossifikation.

Bei der enchondralen Ossifikation entsteht ein knöcherner Kallus aus einem Knorpelmuster in dem die dominierenden Zellen Chondrozyten und Fibroblasten sind. Die Chondrozyten proliferieren und synthetisieren knorpelige Matrix bis das Granulationsgewebe vollständig durch Knorpel ersetzt wurde³². Dadurch entsteht ein Kallus, der eine gewisse Stabilität aufweist³³. Dieser ist zunächst noch avaskulär, es wandern aber Endothelzellen ein. Die in die Matrix eingebetteten Chondrozyten werden hypertroph und gehen in Apoptose. Währenddessen wird die Matrix resorbiert und die neuen Gefäße sprossen ein^{34,35}. Viele Osteoblasten beginnen Geflechtknochen, bestehend aus Proteinen und mineralisierter extrazellulärer Matrix, zu synthetisieren.

Bei der parallel ablaufenden intramembranösen Ossifikation bildet sich vom Periost aus Geflechtknochen an den Kortizes. Dies geschieht direkt ohne die vorherige Bildung von Knorpel. Die im Periost befindlichen osteoblastären Vorläuferzellen differenzieren zu reifen Osteoblasten und bilden Geflechtknochen. Auch im endostalen Frakturbereich bildet sich ein Kallus aus Geflechtknochen.

Remodeling

Die Remodelingphase ist die längste Phase der Frakturheilung. In ihr wird der Geflechtknochen durch Lamellenknochen ersetzt, das Knochenmark wiederhergestellt³² und der Knochen kehrt zu seiner Ausgangsstruktur zurück.

1.2 Das Immunsystem

Der Prozess der Frakturheilung beginnt immer mit einer inflammatorischen Reaktion. Verantwortlich für diese Reaktion sind Zellen und Mediatoren des Immunsystems. Dieses wurde von multizellulären Organismen als Mechanismen entwickelt um Pathogene zu bemerken, mit einer schnellen Antwort zu reagieren und diese Pathogene zu bekämpfen. Die erste Abwehrreaktion kommt von Zellen des angeborenen Immunsystems³⁶. Charakteristisch für dieses ist, dass es keine antigen-spezifischen Erkennungssysteme besitzt und auch keine Gedächtnisfunktion existiert³⁷. Das angeborene Immunsystem besteht aus 1) Phagozyten (Neutrophilen, Monozyten und Makrophagen), die spezielle Rezeptoren haben um Pathogene zu erkennen und aufzunehmen, 2) den natürlichen Killerzellen (NK-Zellen), die etwa 10-15% der im Blut vorhandenen Lymphozyten ausmachen und ebenso spezifische Marker und Rezeptoren besitzen und 3) dem Komplementsystem, dessen Hauptfunktionen das Abtöten von Mikroorganismen, die Aktivierung von Leukozyten und Mastzellen, die Bildung von Immunkomplexen und die Regulation der Antikörper-Produktion von B-Lymphozyten ist³⁸. Dem angeborenen Immunsystem steht das adaptive oder erworbene Immunsystem gegenüber (Abb. 5).

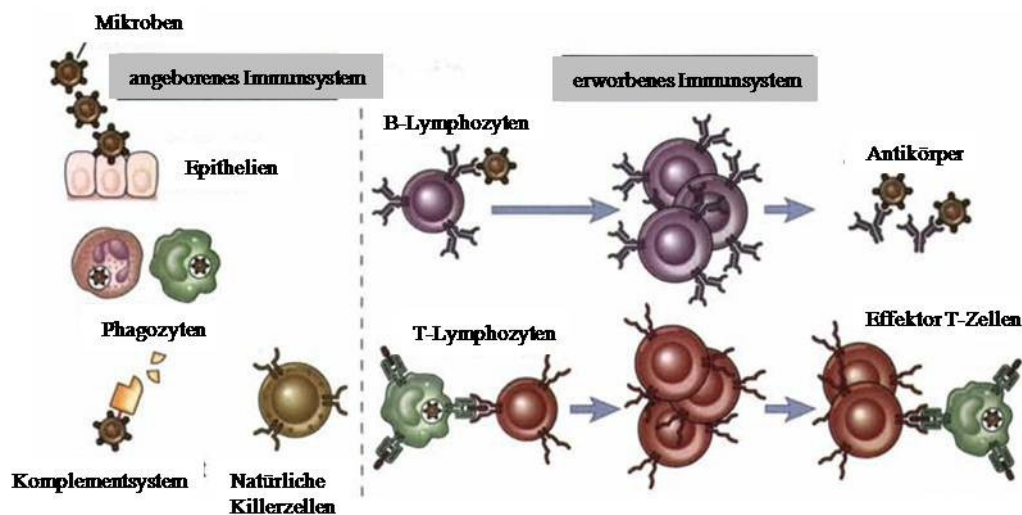


Abb. 5: Übersicht über die Bestandteile des Immunsystems mit dem angeborenen Immunsystem links und dem erworbenen Immunsystem auf der rechten Seite. Dargestellt sind sowohl die zellulären als auch die humoralen Bestandteile (Abbas et al. 2007³⁹)

1.2.1 Das erworbene Immunsystem

Das erworbene Immunsystem zeichnet sich durch seine Anpassungsfähigkeit gegenüber neuen oder veränderten Pathogenen aus. Die Zellen dieses Immunsystems sind in der Lage spezifische Strukturen (Antigene) der Pathogene zu erkennen und gezielt durch zelluläre Abwehrmechanismen oder die Produktion spezifischer Antikörper zu bekämpfen. Zwei Zellpopulationen machen den Hauptbestandteil der Abwehr aus. Dabei handelt es sich einerseits um T-Lymphozyten, welche im Thymus entstehen und eine zellvermittelte Abwehr gewährleisten und die B-Lymphozyten unterstützen und andererseits um die B-Lymphozyten selbst, die Antikörper sezernieren können, die gegen Pathogene gerichtet sind. Nach der Abwehr eines Pathogens bleiben spezifische Antikörper und Gedächtniszellen erhalten, um bei einem erneuten Kontakt mit demselben Pathogen eine schnellere und effizientere Abwehr zu ermöglichen.

T-Lymphozyten

Gesunde junge Erwachsene besitzen etwa 25×10^9 reife T-Zellen im Knochenmark. Das entspricht etwa 3-8% aller kernhaltigen Zellen des menschlichen Körpers.

T-Lymphozyten entstehen aus lymphoiden Vorläuferzellen des Knochenmarks, die über das Blut in den Thymus gelangen. Innerhalb von vier Wochen durchlaufen sie die drei Hauptstadien der T-Zell-Entwicklung 1) das doppelt negative Stadium (DN), 2) das doppelt positive Stadium (DP) und 3) das einzeln positive Stadium (SP). Zunächst wandern die Vorläuferzellen aus dem Blut in den Thymuskortex ein und befinden sich im DN1 Stadium. Sie beginnen das für T-Lymphozyten spezifische Oberflächenantigen CD3 zu exprimieren und gehen in das DN2 Stadium über. Vor dem Übergang zum DN3 Stadium muss in den T-Lymphozyten eine Rekombination ihrer Keimbahn-DNA stattfinden um einen funktionellen prä-T-Zellrezeptor zu exprimieren. Zellen, die dazu nicht in der Lage sind, gehen in Apoptose. Anschließend gehen die Zellen in das DP Stadium über, in dem sie die Oberflächenantigene CD4 und CD8 exprimieren. Kommt es in diesem Stadium zu einer positiven Selektion der T-Zelle, verlässt sie als SP-Zelle (CD4 oder CD8 positiv) den Thymus und zirkuliert in den sekundären lymphatischen Organen, bis sie auf ihr Antigen trifft. Bei den CD4 positiven Zellen handelt es sich um T-Helfer-Zellen, die spezifische Zytokine sezernieren und für die Aktivierung von B-Lymphozyten verantwortlich sind. Die CD8 positiven Zellen sind zytotoxische T-Zellen,

die nach ihrer Aktivierung in der Lage sind in ihren Zielzellen eine Apoptose auszulösen. Der T-Zell Rezeptor (TCR) erkennt Antigene nicht direkt, sondern über vorher prozessierte Peptide, die ihm von antigenpräsentierenden Zellen (APC) präsentiert werden. Beim TCR handelt es sich um einen transmembranen Rezeptor, der stark mit Ko-Rezeptoren assoziiert ist. Über diese Rezeptoren ist die Zelle in der Lage zur Signaltransduktion, zur Kontrolle ihrer zellulären Funktionen und zur Reaktion auf verschiedene Stimuli. Abhängig vom aktivierten T-Zell Typ erfolgt eine Eliminierung des Pathogens. Die CD4 positiven T-Lymphozyten können nach der Stimulation mit einem präsentierten Antigen in verschiedene Subpopulationen (T_H1 , T_H2 , T_H17 und T_{reg}) differenzieren. Dabei unterscheiden sich die mit ihrem Rezeptor assoziierten Ko-Rezeptoren, ihre Zytokinproduktion und die Zell-Zell-Interaktionen⁴⁰. Zytokine der T_H1 Zellen sind beispielsweise Interleukin 2 (IL2), Interferon- γ (IFN γ) und Tumornekrosefaktor β (TNF- β)⁴¹. Je nachdem wie lange die Interaktion der APC mit dem Rezeptor der T-Zelle andauert, entscheidet sich das weitere Schicksal der T-Zelle. Kommt es zu einer zu starken Stimulation, geht die T-Zelle in Apoptose, um eine spätere zytotoxische Reaktion gegen eigene antigen-präsentierende Zellen zu verhindern. Ein langes Signal sorgt für die Differenzierung zur Effektorzelle und ein etwas kürzeres, jedoch kein sehr kurzes, Signal für die Differenzierung zur Gedächtniszelle³⁸.

90% der im peripheren Blut vorkommenden T-Lymphozyten liegen in einer $\alpha\beta$ Konfiguration des TCR vor, die restlichen T-Zellen weisen einen $\gamma\delta$ TCR auf⁴². Diese Zellen besitzen nicht nur die charakteristischen Eigenschaften der adaptiven Immunantwort, sondern haben auch Eigenschaften des angeborenen Immunsystems. Sie sind Zellen, die eine Brücke zwischen beiden Teilen des Immunsystems schlagen⁴³. Sie reagieren nicht auf Antigene der $\alpha\beta$ T-Lymphozyten⁴⁴ und kommen hauptsächlich in der Epidermis vor. Hier wird ihnen eine wichtige Rolle in der Wundheilung zugeschrieben⁴⁵.

B-Lymphozyten

Die B-Lymphozyten stellen etwa 15% der im peripheren Blut vorkommenden mononukleären Zellen⁴⁶. Sie entstehen und differenzieren im Knochenmark aus hämatopoetischen Stammzellen unter dem Einfluss der von Stromazellen sekretierten Zytokine⁴⁷. In ihrem Reifeprozess muss die B-Zelle verschiedene Stadien durchlaufen. Das initiale Stadium ist das pro-B-Zell Stadium. Am Ende dieses Stadiums muss die Zelle in der Lage sein, eine schwere Kette ihres

Immunglobulin (Ig)-Rezeptors zu exprimieren, um in das prä-B-Zell Stadium zu gelangen. Exprimiert die Zelle dann einen kompletten Immunglobulin-Rezeptor (IgM), wird sie zur naiven B-Zelle. Sie wandert aus dem Knochenmark in das periphere Blut ein, wo auch die T-Lymphozyten zirkulieren. Alle B-Lymphozyten, die nicht von T-Lymphozyten gebunden werden, gehen in Apoptose. Kommt es zu einer Bindung, wandern die B-Zellen anschließend in den Lymphfollikel ein und beginnen zusätzlich zum IgM auch noch Immunglobuline der Klasse D zu exprimieren. Diese naiven B-Lymphozyten beginnen dann zwischen sekundären lymphatischen Organen und Knochenmark zu zirkulieren, bis sie auf ihr spezifisches von einer T-Zelle präsentiertes Antigen treffen. Nach der Stimulation des B-Zell-Rezeptors (BCR) durch das Antigen und durch weitere ko-stimulatorische Signale, wandern die B-Zellen in die Keimzentren der Lymphknoten ein und durchlaufen eine Affinitätsreifung (Mutation in Genen der Immunglobuline und daraus folgend verbesserte Antigen-Spezifität) und einen Klassenwechsel (Wechsel der konstanten Region des Immunglobulins). Gleichzeitig wird bei der Aktivierung in den B-Lymphozyten ein Differenzierungsprogramm initiiert, dabei wird abhängig vom ko-stimulatorischen Signal entschieden, ob die Zelle eine Gedächtniszelle oder eine Antikörper-produzierende Plasmazelle wird⁴⁰.

1.2.2 Die RAG1^{-/-} Maus als Modell

Um den Einfluss des Immunsystems auf die Frakturheilung zu untersuchen wurde daher die RAG1^{-/-} Maus genutzt, die keine reifen B- und T-Lymphozyten besitzt. Wie im vorherigen Kapitel beschrieben, besitzen sowohl B-Zell- als auch T-Zell-Rezeptor eine hohe Variabilität und Spezifität. Diese wird über die V(variable)-D (diversity)-J (joining)-Rekombination ermöglicht, die sehr strikt reguliert ist. Sie läuft in verschiedenen Schritten ab, ist aber vom Grundmechanismus in beiden Lymphozyten-Populationen gleich. Es befinden sich hintereinander auf verschiedenen Genloci viele unterschiedliche V-, D- und J-Regionen, die miteinander kombiniert werden können. In B-Lymphozyten gibt es beispielsweise 40 verschiedenen V-Segmente für die Bildung einer leichten Rezeptorkette. Da ein Immunglobulin-Rezeptor aber aus zwei leichten und einer schweren Kette zusammengesetzt ist ergeben sich sehr viel mehr Kombinationsmöglichkeiten (Abb. 6).

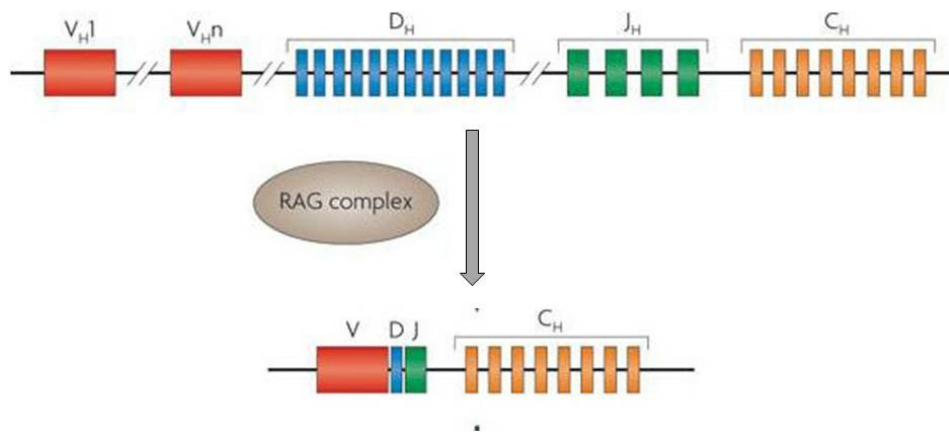


Abb. 6: Genloci der V-, D- und J-Regionen vor der genomischen Rekombination und als Endprodukt der somatischen Rekombination (modifiziert nach Mani *et al.*, 2010⁴⁶)

Die V-(D)-J-Rekombination läuft gewebespezifisch nur in lymphoiden Zellen ab, sie ist stammspezifisch und sorgt für einen Immunglobulinumbau in B-Zellen und einen TCR-Genumbau in T-Zellen und sie findet entwicklungsspezifisch nur in pro- und prä-B- und T-Zellen statt⁴⁸. In diesem Stadium muss in beiden Zellpopulationen ein prä T- bzw. ein prä-B-Zell-Rezeptor exprimiert werden. Geschieht dies nicht, erhalten die Zellen keine Überlebenssignale und gehen in Apoptose.

Zu Beginn des Rekombination-Prozesses der Keimbahn-DNA erkennen zwei RAG (recombination activating gene)-Proteinkomplexe jeweils eine Rekombinationssignalsequenz (RSS-Sequenz) an den zu verknüpfenden Enden. Jeder dieser Komplexe besteht aus einem RAG1, einem RAG2 und Proteinen der hochmobilen Gruppe. Die RSS-Sequenzen liegen neben den codierenden zu verknüpfenden Sequenzen, die dann zu einem funktionsfähigen Rezeptor führen. Unter Ausbildung einer Haarnadelschleife binden beide RAG-Proteinkomplexe aneinander und bringen so die zu kombinierenden Sequenzen zusammen. Die Endonukleaseaktivität der Proteinkomplexe führt anschließend zu zwei DNA-Einzelstrangbrüchen. Verschiedene Hilfsproteine binden an die geschnittenen Enden, stabilisieren und verlängern sie. Am Schluss des Prozesses verbindet die Ligase IV die Enden miteinander³⁸ (Abb. 7).

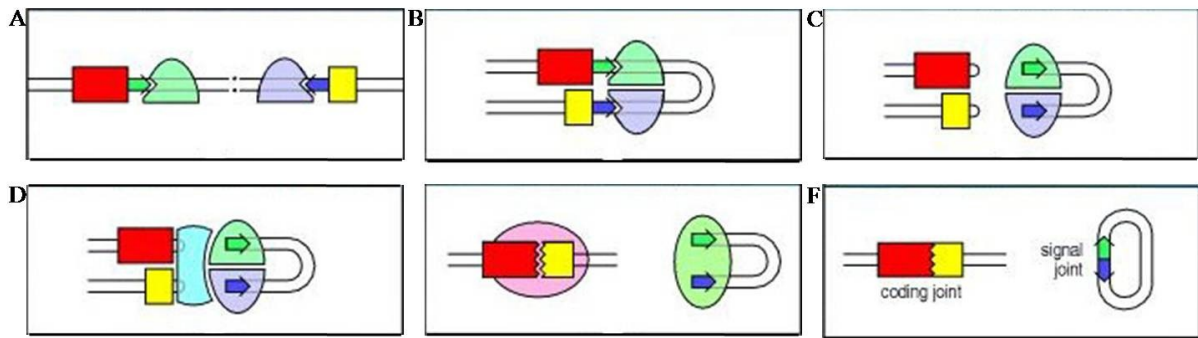


Abb. 7: Übersicht über den Rekombinationsprozess. A) Bindung des RAG-Komplexes an die RSS, B) Ausbildung der Haarnadelstruktur, C) DNA-Bruch und Haarnadelstruktur der codierenden Sequenzen, D) Hilfsproteine schneiden Haarnadelstruktur, E) Verlängerung der Enden und F) Ligation der Enden (modifiziert nach Janeway *et al.*, 2002³⁸)

Die RAG1^{-/-} Maus wurde 1992 durch die Wissenschaftler um Mombaerts generiert. Diese deletierten das RAG1 Gen in pluripotenten embryonalen Stammzellen der Maus und erzeugten so Mäuse, die homozygot für die RAG1 Mutation waren⁴⁹ und keine reifen B- und T-Lymphozyten ausbildeten. Etwa zeitgleich wurde auch von einer RAG2 Mutante derselbe Phänotyp beschrieben⁵⁰. Aus diesem Grund gehen Wissenschaftler heute davon aus, dass beide RAG Gene für eine funktionelle Rekombination erforderlich sind. Fehlt eines der Gene, stoppt der T-Lymphozyt seine Entwicklung am Übergang zwischen pro- und prä-T-Zelle. Er ist in diesem Stadium CD3⁻, CD25⁺, CD4⁻ und CD8⁻⁵¹. Auch die B-Zelle stoppt in dieser Phase ihre Entwicklung und ist positiv für B220 und CD43, aber negativ für CD25⁵². Äußerlich unterscheidet sich die RAG1 Mutante nicht vom Wildtyp Tier, ist fortpflanzungsfähig und hat in etwa die gleiche Lebenserwartung. Der Thymus hingegen weist deutliche Unterschiede auf. So ist er generell kleiner und hat keine funktionelle Stromastruktur entwickelt, es fehlen viele kortikale und medulläre Marker. Auch die Milz weist etwa 5-10 Mal weniger Zellen auf⁵³. In nicht lymphatischen Geweben hingegen konnte eine erhöhte NK-Zellzahl gefunden werden, die mit dem Verlust der T-Zellen korreliert. So sind die NK-Zellzahlen in der Lunge etwa verdreifacht, während in der Leber die doppelte Menge an NK-Zellen vorliegt⁵⁴. Da diese Tiere keine antigen-spezifischen Immunantworten generieren können, sind sie anfälliger für Viren, Pilze und andere Infekte. Auch in Neuronen des Hippocampus konnte RAG1 detektiert werden, dabei handelt es sich um eine limbische Region, die mit Lernen und dem Gedächtnis in Zusammenhang gebracht wird. Untersuchungen der RAG1 Mutante zeigten veränderte neuronale Verhaltensweisen, so war beispielsweise die Bewegungsaktivität der Tiere stark verändert. Sie waren viel schneller mit einer neuen Umgebung vertraut und bewegten sich in ihr schnell und ohne Angst, woran auch

Veränderungen des Lichtverhältnisses nichts änderten. Auch eine reduzierte Stressantwort konnte beobachtet werden⁵⁵. RAG 2 konnte im Gehirn nicht nachgewiesen werden⁵⁶.

Bevor es die RAG1^{-/-} Maus gab, wurde für Untersuchungen zur Funktion des Immunsystems die SCID Maus (severe combined immunodeficiency) genutzt. Bei dieser Maus können aber noch kleine Mengen Immunglobuline durch das Immunsystem gebildet werden.

Auch beim Menschen gibt es diese SCID-Erkrankung, die in 20% der Fälle mit einem Verlust aller B- und T-Lymphozyten einhergeht⁵⁷. Generell handelt es sich bei SCID um eine genetische Veränderung, die zu einer Beeinträchtigung bzw. Verminderung der Lymphozyten-Funktion führt⁵⁸. Charakteristisch für alle SCID-Patienten ist aber ein Mangel an T-Zellen, B- und NK-Zellen sind nur in selteneren Fällen betroffen. Mit einer Inzidenz von 1:100 000 Neugeborenen ist SCID eine seltene Krankheit⁵⁹. Eine häufiger auftretende Erkrankung ist das Omenn Syndrom, bei dem es nicht zu einem Funktionsverlust wie bei SCID kommt, sondern kleinere Mutationen in RAG1 oder RAG2 auftreten. Bei dieser Erkrankung haben die betroffenen Patienten keine B-Lymphozyten, weisen aber im Blut aktivierte T-Zellen mit eingeschränkter Diversität auf⁶⁰. Patienten sterben in den ersten Lebensjahren an schweren Infektionen, wenn sie nicht eine Knochenmarkstransplantation erhalten. Nur durch diese Knochenmarkstransplantation können die Patienten dann mit Hilfe von immunsuppressiven Therapien und Infektionsprophylaxen ein normales Leben führen⁶¹.

1.3 Osteoimmunologie

1.3.1 Interaktion zwischen Knochen- und Immunsystem

Das Forschungsfeld der Osteoimmunologie befasst sich mit den Wechselwirkungen zwischen Immunsystem und Knochenzellen. Seit einigen Jahren zeigen immer mehr Untersuchungen, dass das Immunsystem die Funktionen der Knochenzellen beeinflussen kann. Die Knochenzellen stammen von zwei unterschiedlichen Entwicklungslinien ab.

Osteoklasten, die knochen-abbauenden Zellen, haben denselben Ursprung wie myeloide dendritische Zellen und Zellen der Makrophagen-Linie. Sie reagieren daher auf viele Zytokine, die auch die Entwicklung und Funktion von dendritischen Zellen und Makrophagen regulieren. Die Tatsache, dass RANKL von aktivierten T-Lymphozyten produziert wird und seine Funktion in der Stimulation der Osteoklastendifferenzierung und deren Überleben hat, zeigt die Verbindung zwischen Knochenzellen und Zellen des Immunsystems.

Die Osteoblasten hingegen stammen von den mesenchymalen Stammzellen ab und sind für die Sekretion der extrazellulären Matrix verantwortlich. Zusätzlich sind sie in der Lage die Funktion der Osteoklasten zu regulieren und unterstützen das Wachstum und die Differenzierung der hämatopoetischen Zellen⁶².

IL1 war eines der ersten Zytokine, dem eine Rolle im Knochenmetabolismus nachgewiesen wurde. IL1 stimuliert die Resorption des Knochens⁶³. Es ist aber auch ein Vermittler verschiedener inflammatorischer Immunantworten und stimuliert die Synthese von Prostaglandinen, die wiederum die Knochenresorption unterstützen. Gleichzeitig ist IL1 in der Lage die Aktivität der Osteoblasten zu inhibieren und so dem Knochenaufbau entgegenzuwirken. Den Zytokinen TNF⁶⁴ und IL6⁶⁵ werden die gleichen Funktionen wie IL1 zugeschrieben. In Tabelle 1 sind einige wichtige Zytokine und ihre Wirkung auf Osteoblasten und Osteoklasten zusammengefasst. In Abbildung 8 ist die Wirkungsweise der Zytokine graphisch dargestellt.

Tab. 1: Selektion relevanter Zytokine und ihr Einfluss auf Osteoblasten und Osteoklasten (modifiziert nach Datta *et al.*, 2008⁵)

Zytokin	Effekt auf Knochenverlust	Mögliche Mechanismen	
		Osteoklasten	Osteoblasten
RANKL	↑	erhöht Differenzierung Aktivierung inhibiert Apoptose	
IL-1	↑	erhöht Differenzierung Aktivierung	induziert RANKL
IL-4	↓	inhibiert Differenzierung vermindert RANK- Expression	
IL-6	↑	erhöht Differenzierung	induziert RANKL
IL-7	↑	indirekt über T-Zellen	
IL-10	↓	inhibiert RANK-Signale	Chemotaxis
IL-12	↓	indirekt, induziert IFN- γ	
IL-17	↑	erhöht Differenzierung induziert RANK	induziert RANKL
IL-18	↓	indirekt, induziert IFN- γ	
TNF-α	↑	erhöht Mobilität der Vorläuferzellen Aktivierung	Hemmung
IFN-α/β	↓	inhibiert RANKL- Signale	
M-CSF	↑	erhöht Proliferation und Überleben	
GM-CSF	↓	inhibiert RANKL- Signale	
OPG	↓	erhöht Differenzierung inhibiert RANKL-Signale erhöht Apoptose	

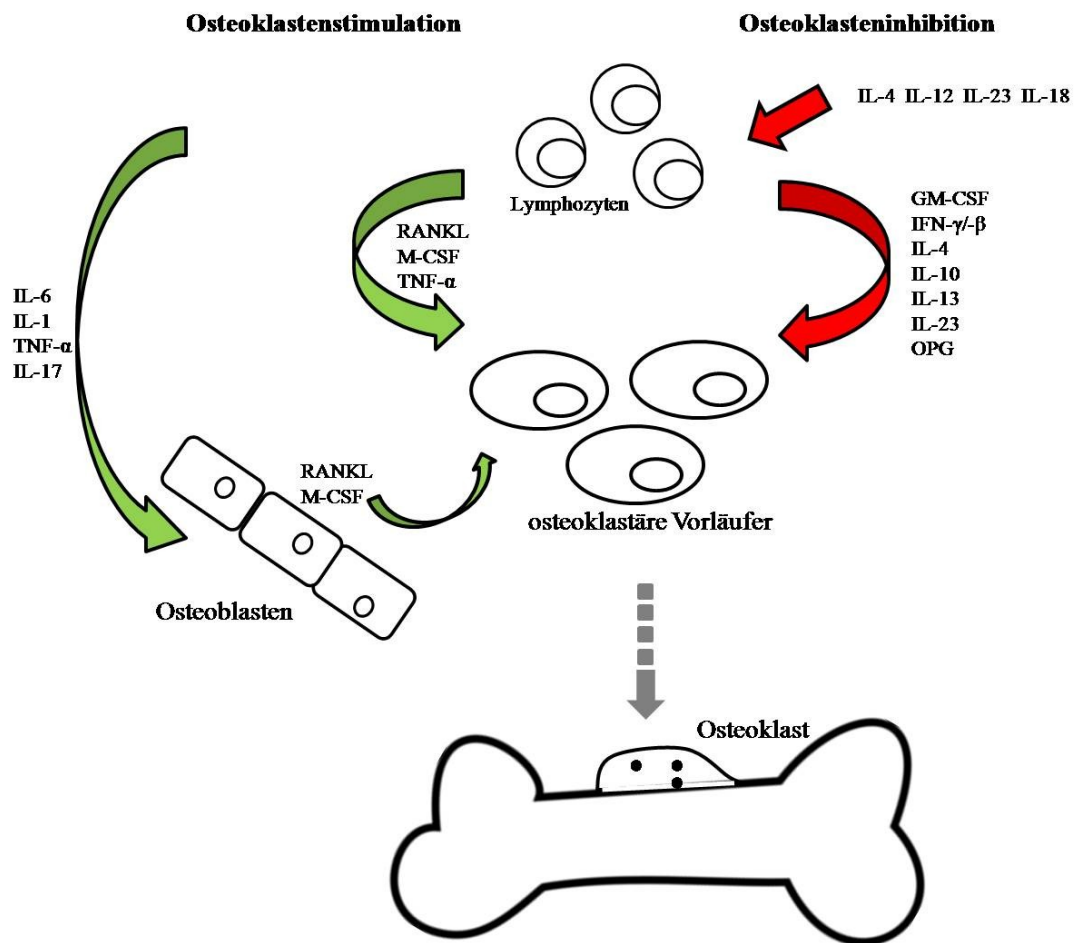


Abb. 8: Zusammenfassung der Interaktion zwischen Osteoblasten, Osteoklasten und den Lymphozyten; grün stimulierende und rot inhibierende Wirkung (modifiziert nach Martin *et al.*, 2011¹³)

Das RANK/RANKL System ist eines der wichtigsten Systeme, welches das Zusammenspiel zwischen Osteoblasten und Osteoklasten reguliert. RANK befindet sich auf der Oberfläche von Osteoklasten und sorgt nach Bindung von RANKL für die Differenzierung reifer Osteoklasten aus osteoklastären Vorläuferzellen. RANKL wird von Osteoblasten sowie aktivierten B- und T-Lymphozyten produziert. Mäuse ohne RANK oder RANKL weisen durch die Abwesenheit von Osteoklasten starke Osteopetrosen auf⁶⁶. Ohne RANK/RANKL kommt es auch zu Defekten in den sekundären lymphatischen Geweben⁶⁷, es fehlen Lymphknoten und die Tiere weisen in der Milz anomale B-Zell-Follikel auf⁶⁸.

RANKL kann aber auch durch Osteoprotegerin (OPG) von B-Lymphozyten oder Osteoblasten gebunden werden. Dann inhibiert es die Bindung an RANK und verhindert so die Differenzierung von Osteoklasten und die Knochenresorption. Vierundsechzig Prozent des gesamten im Knochenmark vorkommenden OPG werden von B-Lymphozyten synthetisiert, wobei die Expression in den einzelnen Entwicklungsstufen unterschiedlich ist und von unreifer zu reifer

geschieht ebenso in Gedächtnis-T-Zellen, wohingegen ruhende Lymphozyten die Osteoklastogenese supprimieren⁷⁰. Einige Studien zeigen, dass CD4 positive Lymphozyten eine Schlüsselrolle in der Vermittlung von Knochenzerstörung in immun-vermittelten inflammatorischen Erkrankungen wie der Rheumatoiden Arthritis besitzen⁷¹. Unter physiologischen Bedingungen können T-Lymphozyten aber durchaus auch protektive Wirkung besitzen, so wurde gezeigt, dass die Osteoklastogenese durch CD8⁺ Zellen inhibiert wird⁷². Diese zeigen im Vergleich mit den CD4⁺ Zellen eine langsamere Kinetik in der Expression von RANKL. Die protektive Rolle der Lymphozyten ist durch *in vivo* Studien bewiesen in denen B- und T-Zell-defiziente Tiere eine erniedrigte Knochenmineraldichte (BMD) aufweisen. Wenn nur T-Zellen fehlen, zeigen die Tiere hingegen eine normale BMD, die im juvenilen Stadium geringer ist und mit dem Alter zunimmt⁷³.

Wenig ist bis jetzt über die Rolle der Lymphozyten in der Frakturheilung bekannt. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass Lymphozyten eine wichtige Rolle im Erhalt der Knochenhomöostase besitzen und ein Umbau des Knochens lebenslänglich stattfindet. Anatomisch ist das Knochenmark kaum kompartimentiert und ermöglicht so eine ständige Interaktion zwischen Immun- und Knochenzellen, eben auch wenn das Immunsystem aktiviert wurde. Auch unter physiologischen Bedingungen werden körpereigene und –fremde Antigene präsentiert und sorgen für eine geringe aber konstant anhaltende Immunreaktion, die die Knochenhomöostase beeinflusst.

1.4 Zielsetzung und Hypothese

Leukozyten besitzen neben ihrer zentralen Rolle in der Abwehr von Pathogenen auch essentielle Funktionen bei der Knochenreparatur, da sie die Frakturheilung initiieren und die physiologische inflammatorische Antwort regulieren. Knochenfrakturen stimulieren die Expression verschiedener Zytokine und somit die Rekrutierung von Leukozyten. Diese infiltrieren das Hämatom und produzieren verschiedene Wachstums- und Differenzierungsfaktoren, ebenso Faktoren für die Angiogenese und die Differenzierung und Migration von mesenchymalen Stammzellen^{74,75}. Wenige Tage nach der Fraktur sind zusätzlich noch Osteoblasten und Chondrozyten die Quelle der inflammatorischen Zytokine⁷⁶. Studien beweisen, dass die Entfernung des Hämatoms zu einer verzögerten Heilung führen kann oder diese sogar völlig ausbleibt⁷⁷. Dies macht die osteoinduktive Fähigkeit des Frakturhämatoms deutlich.

Mithilfe des RAG1^{-/-} Tiers soll in dieser Studie der Einfluss von B- und T-Lymphozyten auf die Frakturheilung untersucht werden. Dabei sollen Unterschiede in den Heilungsverläufen zwischen Wildtyp mit Immunzellen und RAG1^{-/-} ohne reife Lymphozyten herausgearbeitet werden. Um die klinische Behandlung nicht heilender Frakturen zu verbessern, ist es nötig die genauen Mechanismen von Inflammation und der Interaktion von Immunzellen und Knochenzellen detailliert zu verstehen. Es müssen Zellpopulationen beziehungsweise deren Zytokine identifiziert und analysiert werden, die positive und negative Einflüsse auf die Frakturheilung haben können.

Es ist bereits bekannt, dass B- und T-Lymphozyten sowohl positive als auch negative Einflüsse auf die knochenbildenden und –resorbierenden Zellen haben können. Da für den Beginn der Frakturheilungskaskade eine inflammatorische Reaktion essentiell ist und die Lymphozyten die Differenzierung und Aktivierung von Osteoklasten und Osteoblasten beeinflussen, war die Hypothese dieser Arbeit, dass die Abwesenheit des adaptiven Immunsystems einen negativen Einfluss auf die Frakturheilung in der RAG1^{-/-} Maus hat. Die initiale inflammatorische Reaktion wird durch die Abwesenheit von B- und T-Zellen abgeschwächt und das Gleichgewicht zwischen Osteoblasten und Osteoklasten gestört. Dies führt zu einer verzögerten Heilung.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere zur Untersuchung der Frakturheilung

Das Versuchstiovorhaben wurde beim Landesamt für Gesundheit und Soziales beantragt und lief unter der Genehmigungsnummer G 0206/08. Die Mäuse kamen von unterschiedlichen Züchtern. Die C57 Bl6/N Tiere wurden sowohl von der Forschungseinrichtung für experimentelle Medizin (FEM) der Charité als auch vom externen Züchter Charles River Laboratories bezogen. Die ebenso in die Versuche einbezogenen knock-out Tiere basierten alle auf dem Bl6 Tierstamm. Hierbei handelt es sich um RAG Bl6/N und die JHT Mäuse vom Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) und die TCRbd Tiere vom FEM (AG Löhning). In allen Versuchen wurden männliche Tiere für die Experimente verwendet. Die C57 Bl6/N Wildtyp (WT) Tiere, die JHT Tiere und auch die RAG Bl6/N ($RAG1^{-/-}$) waren bei der Operation zwischen 8 und 10 Wochen alt. Die TCRbd Tiere hingegen wurden im Alter zwischen 8 und 19 Wochen operiert. Das Körpergewicht der Tiere lag zwischen 22-28 Gramm.

2.1.1 Haltung und Fütterung

Die Versuchstiere wurden während der gesamten Versuchsdauer in einem klimatisierten (20°C) Raum in der FEM der Charité-Campus Virchow Klinikum, Augustenburger Platz 1, 13353 Berlin gehalten. Die Tiere wurden vor der Operation in der Regel in Macrolon Typ 4 Käfigen in Gruppen bis zu 10 Tieren gehalten. Die Fütterung erfolgte mit Nagetierfutter (Ssniff Spezialdiäten GmbH) sowie Wasser ad libitum. Die Einstellung der Tiere in die tierexperimentelle Einrichtung erfolgte spätestens eine Woche vor der Operation, um den Tieren die Möglichkeit der Anpassung und Eingewöhnung zu geben. Entsprechend einem Tag/ Nacht Rhythmus von jeweils 12 Stunden wurde das Licht in den Räumen geregelt. Nach der Operation wurden die Tiere in Gruppen von maximal 4 Tieren in Macrolon Typ 3 Käfigen gehalten. Zur Markierung der einzelnen Versuchstiere wurden Löcher in die Ohren der Tiere gestanzt.

2.1.2 Studiendesign

Die Tiere wurden vor Beginn der Operation randomisiert und der gleichen Operationsmethode unterzogen. Bei allen Tieren wurde am linken Femur eine 3-Punkt Biegefraktur gesetzt und diese mit einem intramedullären Nagel stabilisiert. Die Tiere wurden nach 3, 7, 14, 21 oder 28 Tagen mittels einer Isofluran (Forene[®], Abott GmbH & Co. KG, Wiesbaden, Deutschland)

Narkose und anschließender Überstreckung getötet und für histologische und molekularbiologische Untersuchungen verwendet. Bei allen Tieren wurden beide Femora entnommen und für die Untersuchungen herangezogen. Tabelle 2 enthält eine übersichtliche Auflistung aller für die Untersuchungen notwendigen Tiere.

Tab. 2: Versuchsgruppen. Für die Untersuchung der mesenchymalen Stromazellen (MSC) der WT und RAG1^{-/-} Tiere wurde keine Operation durchgeführt, sondern die Tiere sofort getötet und die Femora entnommen.

Gruppe		WT					RAG1 ^{-/-}					TCRbd	JHT ^{-/-}
Tag		d3	d7	d14	d21	d28	d3	d7	d14	d21	d28	d7	d7
Histologie	Paraffin	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	-	-
	Plastik	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	-	-
	Kryo	3	3	3	3	-	3	3	3	3	-	8	8
Molekularbiologie		5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	-	-
Zellkultur		je 4 native Tiere pro Versuchstiergruppe										-	-

2.2 Operationsmethode

Die Mäuse wurden mittels eines Isofluran/O₂ Gemischs in Narkose (Isotec 4, Groppler Medizintechnik, Deggendorf, Deutschland) gelegt. Anschließend wurde Temgesic[®] (Buprenorphin 1mg/kg Körpergewicht, Reckitt Benckiser, Mannheim, Deutschland) als Schmerzmittel subkutan verabreicht. Nachdem die Maus sich in einer tiefen Narkose befand, wurde das linke Knie mit einem Einmalrasierer vom Fell befreit. Eine Sprühdeseinfektion des Operationsgebietes erfolgte mit Braunoderm[®] (Polividon-Iod, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland). Die Operation begann mit einem Schnitt in die Haut und einer anschließenden Öffnung des Kniegelenks (Abb. 10 A). Die Kniescheibe wurde nach lateral verlagert um das distale Ende des Femurs freizulegen und einen Kanal für den Marknagel zu bohren. Dieser Kanal wurde mit einer Kanüle (Microlance 3, 0,55 x 25 mm, BD Drogheda, Irland) vorgebohrt (Abb. 10B). Nach dem Herausziehen der Kanüle wurde der Marknagel (Thermo spinal needle 17, 0,5 x 0,90 mm, TERUMO EUROPE N.V., Leuven, Belgien) in den Knochenmarksraum eingeführt und mit einem Saitenschneider an die Femurlänge der Maus angepasst (Abb. 10 C). Nach Repositionierung der Patella wurde die Wunde mit einer Einzel-

kopfnah (ETHICON PROLENE 5.0 Metric) verschlossen (Abb. 10 D). Mittels einer Frakturmaschine nach Einhorn et al.⁷⁸ wurde eine 3-Punkt-Biegefraktur im Femur der Maus erzeugt. Dazu wurde die Maus in der Frakturmaschine positioniert, wobei das Knie des Tiers auf der rechten Seite und das Becken auf der linken Seite festgehalten und auf die Vorrichtung verbracht wurde. Ein Schraubstockmechanismus sorgte dafür, dass ein Metallbeil, ähnlich einer Guillotine, herabgesenkt wurde und Druck auf die Mitte des Femurs ausübte, bis dieser brach (Abb. 10 E-F).

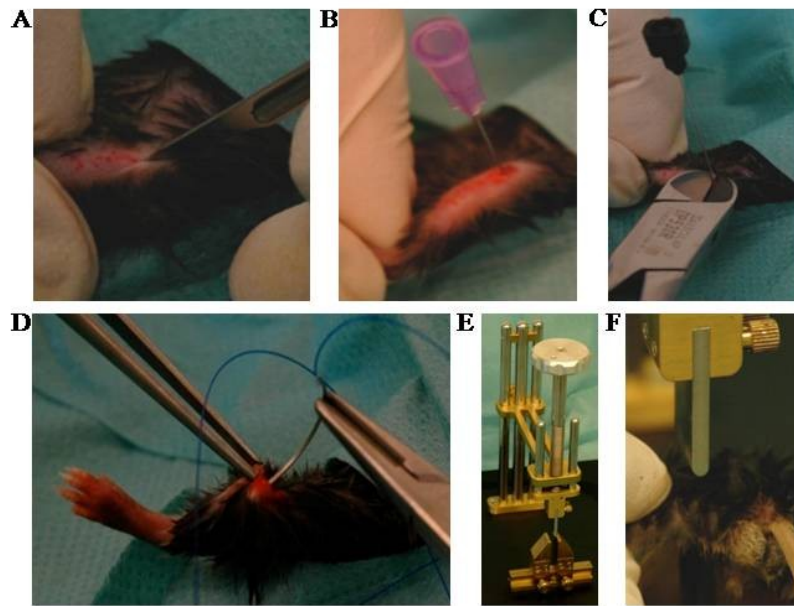


Abb. 10: Übersicht über die einzelnen Schritte der OP. A) Die Haut wird mit einem Schnitt eröffnet. B) Zum Bohren des Markkanals wird eine Kanüle in den Knochenmarkraum eingeführt. C) Der intramedulläre Pin wird mit einem Saitenschneider angepasst. D) Die Wunde wird mit einer Einzelkopfnah verschlossen. E) Frakturmaschine. F) Positionierung der Maus in der Frakturmaschine. Dabei liegt das Knie auf dem rechten Ende der Vorrichtung und das Becken der Maus auf dem rechten Ende.

Zur Kontrolle der Fraktur und der richtigen Position des intramedullären Marknagels wurde am Ende der Operation ein Röntgenbild aufgenommen (SATELEC X-MIND[®] AC, Kohlschein Dental, Altenberge, Deutschland; Kodak DF58, 3 x 4 cm, Roos Dental, Mönchengladbach, Deutschland) und das Gewicht der Maus ermittelt.

Für die Tötung wurden die Mäuse wiederum in Narkose versetzt und anschließend die Wirbelsäule überstreckt. Nochmals wurde zur Kontrolle der Position des Marknagels ein Röntgenbild angefertigt. Anschließend wurde die Haut am Oberschenkel der Maus eröffnet und der Femur mit dem umgebenden Gewebe vorsichtig entnommen. Der Marknagel wurde mit dem Saitenschneider entfernt und der Knochen fixiert.

2.3 Histologische Analyse

Zur Beurteilung der Frakturheilung sollten verschiedene histologische Untersuchungen erfolgen, dazu war es nötig die Knochen in verschiedenen Medien einzubetten um jeweils ein bestmögliches Ergebnis zu erzielen. Für die Einbettung in Paraffin musste der Knochen dekalzifiziert werden, um histologische Färbungen an den Schnitten vornehmen zu können. Die Paraffineinbettung erschwerte aber eine Analyse mittels Antikörpern. Für die spezifische Detektion von Oberflächenmarkern war eine Einbettung der Femora in Kryo-Medium notwendig. Für die *in vivo* Fluoro-chrommarkierung durfte der Knochen nicht entkalkt werden und eine Auswertung der erhaltenen Daten war nur durch eine Einbettung in Plastik möglich.

2.3.1 Gewebeaufbereitung zur Herstellung der Schnitte

Alle Knochen wurden nach der Entnahme in einer 4%igen Paraformaldehyd-Lösung (PFA, Paraformaldehyd reinst, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland; 4% PFA in 1 Liter PBS, pH 9,1) fixiert.

Paraffineinbettung

Um in Paraffin eingebettete Knochen schneiden zu können, mussten diese zunächst entkalkt werden. Dazu wurden die Knochen nach einer 48 stündigen Inkubationszeit in 4%igem PFA bei 4°C in ein 1:2 Gemisch von PFA und einer EDTA-Entkalkungslösung (Herbetta-Arzneimittel, Berlin, Deutschland) gegeben. Dabei handelt es sich um einen Chelator, der die Kalziumionen aus dem Knochen auffängt. Die Dauer der Entkalkung betrug 3 Wochen, wobei die PFA-EDTA-Lösung zweimal in der Woche gewechselt wurde. Nach ihrer vollständigen Entkalkung wurden die Knochen in Einbettkassetten (Sanowa, Leimen, Deutschland) überführt und für eine Stunde unter fließendem Wasser gewässert. Daran schloss sich eine Entwässerung der Knochen im Entwässerungsautomaten (Leica TP1020, Leica Microsystems, Nussloch GmbH, Deutschland) an. In Tabelle 3 ist die Verweildauer der Knochen in den einzelnen Lösungen ersichtlich.

Tab. 3: Schema der Entwässerung

Medium	Stunden
70% Alkohol	1
80% Alkohol	1
96% Alkohol	2
96% Alkohol	2
100% Alkohol	2
100% Alkohol	2
100% Alkohol	3
Xylol	1
Xylol	1,5
Paraffin	2
Paraffin	2

Die Verdünnung der Alkohole erfolgte aus 100% Alkohol (Ethanol 100 Vol-%, denaturiert mit Ethylmethylketon (MEK), Herbeta-Arzneimittel, Berlin, Deutschland) und destilliertem Wasser. Eine Stunde vor der Entnahme der Knochen aus dem Entwässerungsautomaten wurden die Einbettförmchen zum Vorwärmen in den Brutschrank gestellt. Die Knochen wurden anschließend mit der zu schneidenden Seite nach unten in die Einbettförmchen gelegt und mit flüssigem Paraffin (Paraplast Plus tissue Embedding Medium, Tyco Healthcare, Mansfield, USA/ Paraffinbad Leica EG1120, Leica Microsystems, Nussloch GmbH, Deutschland) übergossen. Die Aushärtung erfolgte bei -5°C auf der Kühlplatte (Leica EG1130, Leica Microsystems, Nussloch GmbH, Deutschland) für 15 Minuten.

Zum Schneiden wurden die Blöcke nach einer Kühlung auf einem Eisblock in ein Rotationsmikrotom (RM 2055, Leica Microsystems, Nussloch GmbH, Deutschland) eingespannt und 6µm dicke Schnitte angefertigt. Diese Schnitte wurden zunächst in einen Behälter mit kaltem Wasser überführt und auf einen Objektträger (Marienfeld Laboratory Glassware, Lauda-Königshofen, Deutschland) aufgezogen. Im warmen (42°C) Wasserbad (Leica HI1210, Leica Microsystems, Nussloch GmbH, Deutschland) wurden die Schnitte gestreckt und die Gewebeproben auf den Objektträgern für 24 Stunden im Brutschrank bei 37°C getrocknet.

Plastikeinbettung

Die einzubettenden Knochen wurden für die Plastikeinbettung zunächst für 48 Stunden in 4%igem PFA auf dem Schüttler fixiert. Anschließend erfolgte auch hier eine Entwässerung der Knochen bei Raumtemperatur auf dem Schüttler. Die Verweildauer der Knochen in den einzelnen Alkoholen ist in Tabelle 4 dargestellt.

Tab. 4: Entwässerungsschema für die Plastikeinbettung

Medium	Dauer in Tagen
70% Alkohol	2
80% Alkohol	3
96% Alkohol	3
96% Alkohol	7
100% Alkohol	7
100% Alkohol	7
100% Alkohol	7

Eine Entfettung der Proben in Xylol (Mallinckrodt Baker BV, Deventer, Holland) schloss sich an. Es folgte eine Inkubation in Präinfiltrationslösung auf dem Schüttler für 24 Stunden. Um die Präinfiltrationslösung herzustellen, wurden 1000ml Technovit Basislösung (Technovit® 9100 NEU, Kaltpolymerisierender Kunststoff, Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Deutschland) mit einer Aluminiumionenaustauschersäule (Aluminiumoxid 90 aktiv neutral, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) entstabilisiert. Anschließend wurden auf dem Rührer 5g des Härter 1 (Technovit®, Diabenzylperoxid, Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Deutschland) hinzugefügt und die Lösung so lange gerührt, bis eine vollständige Lösung des Pulvers erfolgte. Danach folgte eine Inkubation der Knochen in Infiltrationslösung. Diese wurde aus 250ml der entstabilisierten Basislösung und 20g PMMA-Pulver (Technovit® 9100 neu, Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Deutschland) hergestellt, nach vollständiger Lösung des Pulver wurde 1g des Härter 1 hinzugefügt.

Für die Einbettung mussten zunächst 2 verschiedene Lösungen angesetzt werden. Zum Einen die Stammlösung A aus 500ml entstabilisierter Basislösung, 20g PMMA-Pulver und 3g Härter 1 und zum Anderen der Stammlösung B aus 50ml entstabilisierter Basislösung, 4ml Härter 2 (N,N, 3, 5 Tetramethylanilin, Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Deutschland) und 2ml des

Reglers (1-Decanthiol, Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Deutschland). Für die Einbettung wurden die Stammlösung A und B im Verhältnis 9:1 gemischt und 5ml davon auf die Probe gegeben. Die Probe befand sich dazu in einem Plastikzylinder der möglichst Luftdicht verschlossen wurde. Die Polymerisation erfolgte für 48 Stunden bei 4°C.

Die fertigen Schneideblöcke wurden mit der Tischanleifmaschine (Phoenix 3000, Jean Wirtz GmbH & Co KG, Düsseldorf, Deutschland) und dem Schleifpapier Körnung 80 (BUEHLER GmbH, Düsseldorf, Deutschland) bis zum Rand des Präparates abgeschliffen. Die Probe wurde dann in ein Hartschnittmikrotom (Police S, Cambridge Instruments, Heidelberg, Deutschland) eingespannt und mit einem Hartmetallmesser (Winkel 40°, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland) 7µm dicke Schnitte angefertigt. Zum Schneiden des Blocks wurde der Block immer wieder mit Schneideflüssigkeit (Alkohol-Triton X 5%-Lösung; Triton X-100, SIGMA ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim, Deutschland) benetzt. Die Schnitte wurden auf den Objektträger gebracht und mit Streckflüssigkeit (sechs Teile 70% Alkohol, vier Teile Butoxyethylacetat) beschichtet, mit einer Kunststoffolie (Kisol-Folie, Kettenbach, Eschenburg/Eibershausen, Deutschland) abgedeckt und in einer Objektträgerpresse eingespannt. Zum Trocknen der Schnitte wurde die Presse für 48 Stunden bei 60°C im Brutschrank belassen.

Kryoeinbettung

Für die Einbettung in Kryo-Medium wurden die Knochen für 2 Stunden in 4%igem PFA bei 4°C aufbewahrt. Anschließend erfolgte eine Inkubation der Knochen in Zuckerlösung mit aufsteigender Konzentration. Handelsüblicher Zucker wurde dafür in destilliertem Wasser gelöst. Zunächst erfolgte die Inkubation in einer 10%igen Zuckerlösung, dann 20% und 30% für jeweils einen Tag bei 4°C. Zur Einbettung wurde in einen Kühlbehälter mit Aceton (Acetone 3221, SIGMA ALDRICH GmbH, Steinheim, Deutschland) und Trockeneis ein Becherglas mit Hexan (n-Hexan > 95% zur Synthese, Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland) gestellt. Die Knochen wurden in eine Einbettform gelegt und mit SCEM Embedding Medium (Section Lab Co Ltd., Hiroshima, Japan) bedeckt. Anschließend wurde die Einbettform in den Becher mit Hexan gehalten, bis das Medium ausgehärtet war. Die Proben wurden bei -80°C gelagert.

Zum Schneiden wurden die Proben in ein Kryotom (Leica CM3050S, Leica Microsystems, Nussloch GmbH, Deutschland) eingespannt und 7µm dicke Schnitte angefertigt. Dafür wurde zunächst der Kryofilm (Cryofilm type II C (9), Section Lab Co Ltd., Hiroshima, Japan) in gebrauchsfertige Stücke geschnitten. Diese wurden vor dem Schneiden auf den Block aufgeklebt und anschließend der Schnitt vollzogen. Der Kryofilm wurde dann vom Block abgenommen und auf einem Objektträger befestigt. Die Schnitte wurden bis zum Gebrauch bei -80°C gelagert.

2.3.2 Movat Pentachrom Färbung zur Darstellung der einzelnen Gewebe

Diese Färbung wurde verwendet, um eine generelle Übersicht über die an der Frakturheilung beteiligten Gewebe zu bekommen. So erscheint mineralisierter Knochen leuchtend gelb, nicht mineralisierter Knorpel in blau-grün und mineralisierter Knorpel in gelb. Bindegewebe stellt sich in dieser Färbung grün rötlich dar und Zellkerne blauschwarz. Die Movat Pentachrom Färbung wurde für die deskriptive sowie für die histomorphometrische Auswertung der Schnitte genutzt.

Färbeprotokoll:

1. Entplasten oder Entparaffinieren der Schnitte	2x 10 bzw. 3x 15 Minuten
2. absteigende Alkoholreihe bis a. dest	je 2 Minuten
3. Alcianblau	10 Minuten
4. Leitungswasser (spülen)	5 Minuten
5. alkalischer EtOH (Ethyalkohol)	1 Stunde
6. Leitungswasser (fließend)	10 Minuten
7. a. dest	eintauchen
8. Weigert's Eisenhämatoxylin	10 Minuten
9. a. dest	spülen
10. Leitungswasser (fließend)	15 Minuten
11. Brilliant Crocein- Säurefuchsin	12,5 Minuten
12. 0,5% HAc (Essigsäure)	kurz spülen
13. 5% PWS (Phosphorwolframsäure)	20 Minuten
14. 0,5% HAc	2 Minuten (bewegen)
15. 100% EtOH	3x 5 Minuten
16. Saffron du Gâtinais	1 Stunde
17. 100% EtOH	3x spülen
18. 100% EtOH	2 Minuten
19. Xylol	2x 5 Minuten
20. Eindeckeln mit Vitroclud (Langenbrinck, Labor- und Medizintechnik, Emmendingen, Deutschland)	

Färbelösungen:

Alcianblau

- 1g Alcianblau (8GS, Chroma, 1A288, Hamburg, Deutschland) in 100ml a. dest und 1ml Eisessig

Weigert's Eisenhämatoxylin

- Lösung A: 1g Hämatoxylin (Merck 4302, Darmsatdt, Deutschland) in 100ml 96%igen EtOH lösen und reifen lassen, bis die Lösung rotbraun ist
- Lösung B: 1,16g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Merck 3943, Darmstadt, Deutschland) in 100ml a. dest und 1ml 25%ige HCl lösen
- Gebrauchslösung: Lösung A und B zu gleichen Teilen mischen

Brilliant-Crocein-Säurefuchsin

- Lösung A: 0,1g Brilliant Crocein R (Chroma 1B109, Hamburg, Deutschland) in 99,5ml a. dest und 0,5ml Eisessig
- Lösung B: 0,1g Säurefuchsin (Merck 7629, Darmstadt, Deutschland) in 99,5ml a. dest und 1ml Eisessig
- Gebrauchslösung: A und B 5:1 mischen

5% PWS

- 5g PWS (Chroma 3D092, Hamburg, Deutschland) in 100ml a. dest

Saffron du Gâtinais

- 6g Saffron du Gâtinais (Chroma 5A394, Hamburg, Deutschland) in 100ml 100%igem EtOH
- vor Gebrauch luftdicht bei 50°C für 48 Stunden

2.3.3 TRAP – Färbung zur Darstellung von Osteoklasten

Die TRAP – Färbung (Tartrate resistant acid phosphatase, Tartratresistente saure Phosphatase) wurde genutzt, um Osteoklasten im Paraffinschnitt darzustellen. Dabei handelt es sich um ein von aktiven Osteoklasten synthetisiertes Enzym. Dieses wird mit der Färbung nachgewiesen. TRAP spaltet dabei Phosphat von einer phosphorylierten Naphtholverbindung ab. Das so freigesetzte Naphthol bindet an ein Diazoniumsalz und bildet mit ihm einen Farbstoff, der die Osteoklasten nach dieser Färbung im Schnitt rot erscheinen lässt.

Färbeprotokoll:

1. Entparaffinieren der Schnitte in Xylol	2x 10 Minuten
2. Absteigende Alkoholreihe bis a. dest	je 2 Minuten
3. TRAP-Puffer	10 Minuten
4. TRAP-Färbelösung, 37°C	1 Stunde
5. A. dest	kurz spülen
6. Gegenfärbung mit Methylgrün	15 Minuten
7. a. dest, aufsteigende Alkoholreihe	kurz spülen
8. 100% EtOH	2 Minuten
9. Xylol	2x 5 Minuten
10. Eindeckeln mit Vitroclud	

Färbelösungen:

TRAP-Puffer

- 3,28g Na-Acetat (Merck, 6268, Darmstadt, Deutschland) und 46,01g Na-Tartrate (Merck, 6663, Darmstadt, Deutschland) mit a. dest auf einen Liter auffüllen

TRAP-Färbelösung

- 200 ml TRAP Puffer
- 4 ml N,N-Dimethylformamid (Sigma D4551, Hamburg, Deutschland)
- 2 ml Triton X
- 40 mg Naphthol AS-Mix-Phosphat (Sigma N5000, Hamburg, Deutschland)
- 240 mg Fast Red Violett LB Salt (Sigma F3381, Hamburg, Deutschland)

Methylgrün

- 1g Methylgrün (Merck 1.15944, Darmstadt, Deutschland) in 100 ml a. dest und 25 ml 100% EtOH

2.3.4 Van-Gieson/Von Kossa Osteoid Färbung

Die Van Gieson/Von Kossa Färbung wurde für die Darstellung des Osteoid in den Plastik-schnitten verwendet. Dabei erscheint das Kollagen leuchtend rot, das Osteoid pink und mineralisiertes Knorpel- und Knochengewebe schwarz.

Färbeprotokoll:

1. Entplasten der Schnitte	3x 30 Minuten
2. Absteigende Alkoholreihe bis a. dest	je 2 Minuten
3. 3%ige wässrige Silbernitratlösung (AgNO_3)	10 Minuten
4. a. dest	3x spülen
5. Natriumcarbonat-Formaldehyd-Lösung	2 Minuten
6. Leitungswasser	10 Minuten
7. 5%ige Natriumthiosulfat-Lösung ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$)	5 Minuten
8. Leitungswasser	10 Minuten
9. a. dest	5x eintauchen
10. Weigert's Eisenhämatoxylin	6 Minuten
11. Leitungswasser	10 Minuten
12. Van Gieson Gemisch	3 Minuten
13. 96% EtOH	abspülen
14. 100% EtOH	2x 1 Minute
15. Xylol	2x 5 Minuten
16. Eindeckeln mit Vitroclud	

Färbelösungen:

Silbernitratlösung

- 3g Silbernitrat (Merck, 1512, Darmstadt, Deutschland) in 100 ml a. dest

Natriumcarbonat-Formaldehyd-Lösung

- 5g Na_2CO_3 (Merck, 6392, Darmstadt, Deutschland) mit 25 ml 37% iger Formaldehyd-Lösung mischen, mit a. dest auf 100 ml

Natriumthiosulfat-Lösung

- 5g $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (Merck, 6516, Darmstadt, Deutschland) in 100 ml a. dest

Van Gieson Gemisch

- fertige Lösung von Chroma 2E050 (Hamburg, Deutschland)

2.3.5 Alcianblau-Färbung für den spezifischen Knorpelnachweis

Bei dieser Färbung werden die sauren Mucosubstanzen des Knorpels dargestellt. Im Gegensatz zur Alcianblau-Färbung in der Movat Pentachrom Färbung ist es hier möglich sowohl sulfatierte als auch carboxylierte Gruppen zu färben. Hierbei färben sich die Mucosubstanzen blau, die Zellkerne leicht hellrot und der Hintergrund rosa.

Färbeprotokoll:

- | | |
|---|--------------|
| 1. Kryo-Schnitte auf Raumtemperatur anwärmen lassen | 20 Minuten |
| 2. Schnitte in a. dest rehydrieren | 10 Minuten |
| 3. 3%ige Essigsäure | 3 Minuten |
| 4. 1%ige essigsäure Alcianblau-8GX-Lösung, pH 2,5 | 30 Minuten |
| 5. 3%ige Essigsäure | abspülen |
| 6. a. dest | kurz waschen |
| 7. Kernechtrot | 5 Minuten |
| 8. a. dest | kurz waschen |
| 9. aufsteigende Alkoholreihe | je 1 Minute |
| 10. Xylol | 2x 5 Minuten |
| 11. Eindeckeln mit Vitroclud | |

Färbelösungen:

Alcianblau

- 1g Alcianblau (8GX, A5268, SIGMA-ALDRICH, Hamburg, Deutschland) in 100ml 3%iger Essigsäure. pH 2,5

Kernechtrot

- Kernechtrot-Aluminiumsulfat (2E012, Chroma, Hamburg, Deutschland)

2.3.6 Von Kossa/ Safranin-O-Färbung zur Darstellung von Knochen und Knorpel

Diese Färbung dient dem spezifischen Nachweis von Kalk. Hierbei ist mineralisiertes Knorpel- und Knochengewebe schwarz, die Mineralisationsfronten schwarz granuliert und hyaliner Knorpel intensiv rot. Nicht mineralisiertes Bindegewebe erscheint blaßrot.

Färbeprotokoll:

1. Kryo-Schnitte auf Raumtemperatur aufwärmen lassen	20 Minuten
2. Schnitte rehydrieren	10 Minuten
3. 3%ige wässrige Silbernitratlösung (AgNO_3)	10 Minuten
4. a. dest	3x spülen
5. Natriumcarbonat-Formaldehyd-Lösung	2 Minuten
6. Leitungswasser spülen	10 Minuten
7. 5%ige Natriumthiolsulfat-Lösung ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$)	5 Minuten
8. Leitungswasser spülen	10 Minuten
9. a. dest	5x eintauchen
10. Safranin-O	8 Minuten
11. a. dest	5x eintauchen
12. 96%iger Alkohol	2x 2 Minuten
13. 100%iger Alkohol	2x 2 Minuten
14. Xylol	2x 5 Minuten
15. Eindeckeln mit Vitroclud	

Färbelösungen:

Safranin-O

- 1 g Safranin-O (1382, Merck, Darmstadt, Deutschland) in 100ml a. dest lösen

2.3.7 Deskriptive Analyse zur Beschreibung der Heilung in einzelnen Versuchstieren

Für die deskriptive Analyse wurden pro Untersuchungszeitpunkt die in Paraffin eingebetteten frakturierten Knochen aller 8 Tiere einer Versuchsgruppe mit der Movat Pentachrom Färbung gefärbt und lichtmikroskopisch ausgewertet.

Die Analyse erfolgte in allen Schnitten auf die gleiche Weise. Zunächst wurde die Verschiebung der Kortizes zueinander beurteilt, die Einfluss auf die Kallusgröße hatte. Dabei wurden drei verschiedene Verschiebungen unterschieden: 1. keine Verschiebung, wobei sich hier im Schnitt die Frakturrenden gegenüberstanden, 2. eine mittlere Verschiebung bei der die Frakturrenden gegeneinander verschoben waren und 3. eine starke Verschiebung, bei der sich

proximal laterale und distal mediale Kortizes fast gegenüber standen. Anschließend wurde die Größe des Kallus, dessen Zusammensetzung bezüglich neugebildetem Knochen und proliferierendem, hypertrophen und mineralisiertem Knorpel und eine mögliche knorpelige oder knöcherne Überbrückung des Kallus beschrieben. Jede Kortikalis wurde noch einmal einzeln hinsichtlich Resorption und Struktur analysiert.

2.3.8 Histomorphometrie zur Quantifizierung der Gewebeanteile

Für die histomorphometrische Quantifizierung der Frakturgewebe wurde die Movat Pentachrom Färbung verwendet. Dabei wurden der prozentuale Anteil des neu gebildeten knöchernen Gewebes und des Knorpelgewebes quantifiziert. Zunächst wurde die auszuwertende „Region of Interest“ (ROI) festgelegt. Diese umschloss den gesamten Frakturkallus. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der computergestützten Auswertungssoftware KS Run (KS Run 400, Version 3.0, Carl Zeiss Vision, GmbH Echting, Deutschland). Dieses Programm war in der Lage, gleiche Farbpixel zu messen und als Fläche (mm²) anzugeben.

Von den gefärbten Schnitten wurden zunächst mit einem Lichtmikroskop (Axioskop 40, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Deutschland) Mosaik-Bilder angefertigt und über das Programm AxioVision (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Deutschland) digitalisiert. Anschließend erfolgte die Bearbeitung der Bilder mit Adobe Photoshop7 (Adobe Systems GmbH, München, Deutschland). Dabei wurde die Länge des Bildes auf 2000 Pixel reduziert, um eine Auswertung durch KS Run zu ermöglichen. Nach dem Einlesen des jeweiligen Bildes wurde zuerst der Maßstab von 2 mm gemessen und vom Programm in eine Pixelzahl umgerechnet. Dies war die Grundlage für die Quantifizierung der unterschiedlichen Gewebe. Danach wurden per Hand die Bereiche des Kallus definiert und die zu messenden Flächen markiert. Dabei fragte das Programm beispielsweise nach der Verschiebung der Kortizes zueinander oder dem Bereich des medialen Kallus. Diese wurden mit der Maus umfahren und markiert. Die einzelnen Gewebe wurden anhand ihrer Farbe quantifiziert. Dazu wurden positive Bereiche beispielsweise für Knorpel manuell ausgewählt und das Programm übernahm die Markierung anschließend für alle Pixel der gleichen Farbe. Mithilfe einer parallel erfolgenden Mikroskop-Kontrolle des zu analysierenden Schnitts wurden so alle Knorpelbereiche identifiziert und markiert. Am Ende des Programms wurden alle eingegebenen Parameter berechnet und in einer Tabelle dargestellt.

2.4 Immunhistologische Untersuchungen

2.4.1 Prinzip des immunhistologischen Färbung

Mit Hilfe dieser Färbungen konnten bestimmte Antigene in Geweben und auf Zelloberflächen spezifisch identifiziert werden. Dabei kam es zur Bindung eines spezifischen Antikörpers an ein spezifisches Antigen. Mittels einer Farbreaktion konnte dieser Antigen-Antikörper-Komplex sichtbar gemacht werden. Nach einer Vorbehandlung der Schnitte mit Pepsin (Pepsin A, P-7012, Sigma, Hamburg, Deutschland), Hyaluronidase (Hyaluronidase Type II, H2126, Sigma, Hamburg, Deutschland) oder Trypsin (Trypsin T1426, Sigma, Hamburg, Deutschland) wurde der Schnitt mit einem Normalserum inkubiert. Dabei kam das Normalserum aus derselben Spezies wie der sekundäre Antikörper, damit das Normalserum alle unspezifischen Bindungsstellen besetzte und der sekundäre Antikörper spezifisch an den primären Antikörper band. Anschließend wurde ein unkonjugierter Primär-Antikörper (Primär-AK) auf den Schnitt gegeben, der spezifisch an den zu untersuchende Oberflächenmarker band. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde, in der der AK an seine spezifisches Antigen binden konnte, wurde dieser Primär-AK von einem gegen ihn gerichteten biotinylierten Sekundär-AK detektiert. Ein AB-Komplex (Alkaline Phosphatase universal, AK 5200, Vectastatin ABC Kit, Vector Laboratories, Peterborough, UK) wurde hinzugegeben und band an den sekundären Antikörper. Beim AB-Komplex handelte es sich um ein biotinyliertes Enzym-Avidin Gemisch, welches nach Bindung an den AK in der Lage war ein Substrat umzusetzen. Dazu wurde mittels eines Chromogen-Puffers der ideale pH Wert im Gewebe eingestellt. Ein AP-Substrat (Alkaline Phosphatase substrate kit, SK 5100, Vector Laboratories, Peterborough, UK) wurde anschließend vom AB-Komplex umgesetzt und markierte so das spezifische Antigen farbig. Zur besseren Darstellung des Gewebes erfolgte eine Gegenfärbung mit Hämatoxylin oder Methylgrün.

Kollagen I Nachweis von Knochen

Die Kollagen I Färbung wurde dazu verwendet, um Knochengewebe im Schnitt darzustellen. Dabei wurde der spezifisch an Kollagen I bindende Antikörper anti-collagen type I (Rind-monoklonal, C020121, biologo, Kronshagen, Deutschland) verwendet.

Färbeprotokoll:

1. Schnitte entparaffinieren in Xylol	2x 5 Minuten
2. Absteigende Alkoholreihe bis a. dest	je 2 Minuten
3. PBS	2x 5 Minuten
4. Schnitte mit Fettstift umranden	
5. Hyaluronidase, 37°C	3 Stunden
6. PBS	2x 5 Minuten
7. Normalserum, RT (normal goat serum, Vector Laboratories)	20 Minuten
8. Primärantikörper, 1:500, 4°C (anti-collagen type I, rabbit, C020121, Biologon)	über Nacht
9. PBS	2x 5 Minuten
10. Sekundärantikörper, RT (biotinylated anti rabbit IgG, made in goat, BA 1000, Vector Laboratories)	30 Minuten
11. PBS	2x 5 Minuten
12. AB-Komplex, RT	50 Minuten
13. PBS	2x 5 Minuten
14. Chromogenpuffer	2x 5 Minuten
15. AP-Substrat	bis deutliche Färbung
16. Gegenfärbung mit Hämatoxylin	5 Minuten
17. Bläuen unter fließendem Wasser	5 Minuten
18. aufsteigende Alkoholreihe	je 2 Minuten
19. Xylol	2x 5 Minuten
20. Eindeckeln mit Vitroclud	

Kollagen II- für den Nachweis von proliferierendem Knorpel

Kollagen II, ein von Chondrozyten synthetisiertes Kollagen, wurde für die Detektion von proliferierenden Knorpelzellen genutzt. Dabei wurde nach dem oben beschriebenen Färbeprotokoll vorgegangen. Änderungen werden nachfolgend genannt: Es erfolgte hierbei zunächst eine Inkubation mit Hyaluronidase (2 Stunden, 37°C) und Pepsin (30 Minuten, 37°C) zur Demaskierung der Antigene. Das Normalserum stammte aus dem Pferd (normal horse serum, S 2000, Vector Laboratories, Peterborough, UK). Als Primär-Antikörper wurde mouse

monoclonal to collagene type II (2B1.5, Quartett, Berlin, Deutschland) verwendet. Dieser wurde in einer Verdünnung von 1:50 in DAKO Diluent auf die Schnitte gegeben. Ein biotinylierter anti mouse IgG (made in horse, BA 2000, Vector Laboratories, Peterborough, UK) wurde als Sekundärantikörper benutzt.

Kollagen X- Nachweis hypertrophen Knorpels

Kollagen X wird ebenfalls von Chondrozyten synthetisiert. Jedoch kommt es nur bei hypertrophen Chondrozyten vor. Um eine Unterscheidung zwischen proliferierenden und hypertrophen Chondrozyten zu ermöglichen wurde eine spezifische Kollagen X Färbung durchgeführt. Dabei war eine Vorbehandlung der Schnitte mit Pepsin (2 Stunden, 37°C) und Hyaluronidase (30 Minuten, 37°C) nötig. Wie bei Kollagen II erfolgte auch hier eine Inkubation mit Normalserum aus dem Pferd. Es wurde der mouse monoclonal to collagene type X Antikörper (X53, Quartett, Berlin, Deutschland) in einer Verdünnung von 1: 100 verwendet.

Osteokalzin zum Nachweis der Osteoblasten

Osteokalzin ist ein von Osteoblasten sekretiertes Protein, welches zur extrazellulären nicht mineralisierten Knochenmatrix gehört. Einer Vorbehandlung mit Trypsin (10 Minuten, 37°C) schloss sich eine Inkubation mit Normalserum der Ziege an. Der Primärantikörper ist Osteocalcin (mouse; pAB, ALX 210 333, Enzo Life Sciences, Lörrach, Deutschland), der in einer Verdünnung von 1:4000 eingesetzt wurde. Alle Waschschritte wurden bei der immun-histologischen Färbung mit Osteokalzin in TBS (TRISMA[®] Base, T1503, SIGMA ALDRICH; Trizma[®] hydrochloride, reagent grade T3253, SIGMA ALDRICH, Hamburg, Deutschland; NaCl, Merck, Darmstadt, Deutschland) durchgeführt. Als sekundärer Antikörper fungierte ein biotinylierter anti-rabbit IgG (aus der Ziege, BA 1000, Vector Laboratories, Peterborough, UK).

Gefäßnachweis mit der Faktor VIII Färbung

Faktor VIII ist ein von Endothelzellen produziertes Protein mit dessen Hilfe es möglich ist, Gefäße im histologischen Schnitt zu detektieren. Die Schnitte wurden mit Pepsin (30 Minuten, 37°C) vorbehandelt und anschließend mit Normalserum (goat serum) inkubiert. Es erfolgte eine Bindung des Primär-Antikörpers (Faktor VIII, CP039B, rabbit polyclonal, BioCare Medical, Huissen, Niederlande) bei einer Verdünnung von 1:200.

2.5 Immunofluoreszenz

2.5.1 *In vivo* Fluorochrommarkierung zur Detektion der Dynamik zwischen Knochenbau und Resorption

Die *in vivo* Fluorochrommarkierung ist eine Methode, die angewandt wird um eine Markierung der neuen Mineralisierungsfront zu ermöglichen. Durch eine Markierung mit unterschiedlichen Fluorochromen im zeitlichen Verlauf der Heilung sollte eine Aussage über die Dynamik des Knochenauf- und -abbaus getroffen werden. Dabei lagert sich die Substanz in neu entstehendes Osteoid ein.

Die Fluorochrome wurden in 1,4%iger NaHCO₃ Lösung gelöst. Am Tag 5 nach der Operation wurde allen Tieren das Fluorochrom Alizarinkomplexon (A3882, Sigma, Hamburg, Deutschland) mit einer roten Fluoreszenz verabreicht. Dabei erhielt jede Maus eine Menge von 30mg/kg Körpergewicht. Die zweite Markierung erfolgte an Tag 12 mit Calcein (grüne Fluoreszenz, 20mg/kg KG, C0875, Sigma, Hamburg, Deutschland) und die letzte am Tag 19 mit Calcein blau (blaue Fluoreszenz, 30mg/kg KG, M1255, Sigma, Hamburg, Deutschland). Nach der Tötung wurden die Femora der Tiere entnommen, fixiert und in Plastik eingebettet. Nach dem Anfertigen von 6µm dicken Schnitten wurden die Schnitte am Fluoreszenzmikroskop (Axioskop 40, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Deutschland) fotografiert und über das Programm AxioVision (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Deutschland) digitalisiert. Anschließend erfolgte eine Quantifizierung der fluoreszierenden Fläche ebenfalls mit dem Programm AxioVision.

2.5.2 mehrfach Antigenmarkierung zur Identifizierung spezifischer Zellen und ihrer Lage zueinander

Um die Interaktion zwischen Immunzellen und Knochenzellen nachzuweisen, war eine mehrfach Färbung auf einem Schnitt erforderlich. Mittels der Kryo-Schnitte war es möglich auch spezifisch bestimmte Oberflächenantigene auf Knochen- und Immunzellen zu detektieren, die durch die Einbettung in Paraffin maskiert und daher nicht detektiert werden konnten. Die Schnitte wurden mit dem confokalen Mikroskop (LSM 710, Carl Zeiss, Jena, Deutschland) angeschaut und mit der Software Zen 2011 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Deutschland) in 20 facher Vergrößerung aufgenommen. Die Detailbilder wurden den 20 fach vergrößerten Aufnahmen entnommen und mittels Adobe Photos CS5 (Adobe, Kalifornien, USA) vergrößert.

Färbeprotokoll:

1. Schnitte erwärmen lassen
2. Schnitte mit Fettstift umranden
3. Rehydrierung der Schnitte in PBS 20 Minuten
4. Blockierung (PBS/10% FCS (fötales Kälberserum)/0.01% Tween/10% Rattenserum) 20 Minuten
5. Primärantikörper in (PBS/FCS/Tween) 1 Stunde
6. Waschen (PBS/FCS/Tween) 3x 10 Minuten
7. Sekundärantikörper (wenn nötig) 1 Stunde
8. Waschen (PBS/FCS/Tween) 3x 10 Minuten
9. Dapi 10 Minuten
10. PBS 2x 10 Minuten
11. Eindeckeln mit DAKO Fluorescent Mounting Medium (S3023, DAKO)

Tab. 5: Übersicht über die genutzten Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Klon	Herkunft
B220 Alexa 594	1:200	RA3.6B2	DRFZ
IgM Alexa 546	1:300	M41	DRFZ
IgD Alexa 647	1:100	11-26c	DRFZ
IgG1 FITC	1:500	A85-1	BD Pharmingen
IgG2ab FITC	1:100	R2-40	BD Pharmingen
CD3 Biotin	1:100	eBio500A2	eBioscience
Streptavidin 647	1:1000		invitrogen
CD4 Alexa 546	1:200	GK1.5/4	DRFZ
Laminin	1:100		sigma
Alexa Fluor 488	1:500	A21206	invitrogen
Cathepsin K	1:400	Ab19027	Abcam
F4/80 Alexa 647	1:400	MCA497	Serotec AbD
CD3e PE	1:100	eBio500A2	eBioscience
Osteocalcin	1:4000		EnzoLife Sciences
Alexa Fluor 647	1:600		invitrogen
MBP PE	1:400		DRFZ
CD3 Cy5	1:200	eBio500A2	eBioscience

2.6 Durchflusszytometrie zur Validierung des Tiermodells

2.6.1 Gewinnung der Proben aus Milz, Blut und Knochenmark

Zuerst wurden die Tiere mittels Injektionsnarkose in Narkose versetzt. EDTA wurde in Spritzen aufgezogen und das Blut der Tiere direkt aus dem Herzen gewonnen. Dieses wurde aus der jeweiligen Spritze in ein Blutröhrchen überführt (BD Vacutainer® K2E, Heidelberg, Deutschland). Nach der Tötung der Mäuse wurden Milz, beide Femora und Tibiae entnommen und in sterilem PBS gelagert.

2.6.2 Aufarbeitung der Zellen

Das PBS wurde vorsichtig abgegossen und Knochen und Milz in eine Petrischale (BD Petrischale 353004, Heidelberg, Deutschland) überführt. Die Milz wurde vorsichtig in einen CellTrics Filter (30µm Zellsieb, Partec, Görlitz, Deutschland) gelegt und mit einem Skalpell einmal der Länge nach angeschnitten. Das Zellsieb wurde auf einen 15ml Falcon aufgesetzt und mit FACS-Puffer (5g BSA auf 500ml PBS, 1%ige Lösung) gespült. Mit Hilfe des Stempels einer Spritze wurde die Milz unter mehrmaliger Zugabe von FACS-Puffer zermörsert und die Zellen in den Falcon gebracht. Zum Schluss wurde das Röhrchen mit FACS-Puffer auf 15ml aufgefüllt.

Die Knochen wurden halbiert und die Enden vorsichtig abgeschnitten. Mit einer mit FACS-Puffer gefüllten Spritze wurde das Knochenmark aus den Knochen in ein Zellsieb überführt und ebenfalls in einen Falcon verbracht.

In die Röhrchen mit dem Blut der Tiere wurde währenddessen Lysepuffer (Buffer EL, Erythrocyte Lysis Buffer, Quiagen, Hildesheim, Deutschland) im Verhältnis 1:5 zugesetzt und vermischt, um die Erythrozyten zu lysieren. Dieses Gemisch wurde für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend in der vorgekühlten Zentrifuge (GR412, Thermo Scientific, Bremen, Deutschland) bei 4°C und 300x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Gleichzeitig wurden auch die Zellen von Milz und Knochen zentrifugiert.

Alle Zellen wurden in Lyse-Puffer resuspendiert und wiederum 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte wieder ein Zentrifugationsschritt. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen im zurückbleibenden Überstand resuspendiert. Anschließend wurde eine Zellzählung durchgeführt.

2.6.3 Färbung der Zellen

1x 10⁶ Zellen wurden in FACS-Tubes (BD Falcon 5ml Polystyrene fond rond, Heidelberg, Deutschland) überführt, mit FACS-Puffer gewaschen und zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde noch einmal wiederholt. Alle Proben wurden mit dem Primärantikörper bei 37°C für 15 Minuten inkubiert. Alle anderen Primärantikörper wurden, da sie direkt markiert sind parallel mit dem Sekundärantikörper zur Detektion des ungekoppelten Primärantikörpers inkubiert. Zwei Waschschriffe folgten. Anschließend erfolgte die Inkubation mit den direkt fluoreszenzgekoppelten Antikörpern und dem Sekundärantikörper für 20 Minuten auf Eis (Tab. 6). Nach einem Waschschrift erfolgte die Fixierung der Oberflächen-Färbung mit 2% PFA für 15 Minuten bei Raumtemperatur. Die gefärbten Zellen wurden über Nacht im Kühlschrank gelagert und am nächsten Tag gemessen.

Tab. 6: Auflistung der für die FACS-Färbung genutzten Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Klon	Herkunft
CD8a PB	1:100	53-6.7	BD Pharmingen
Live/dead PO	1:500		Invitrogen
NK 1.1 FITC	1:50	PK 136	eBioscience
TCRb PE	1:50	H57-597	BD Pharmingen
CD3e PerCP	1:20	145-2C11	BD Pharmingen
CCR7 Biotin	1:100	4B12	eBioscience
Streptavidin ECD	1:100		BD Pharmingen
B220 Pe_Cy7	1:50	RA3-6B2	BD Pharmingen
CD62L APC	1:100	MEL-14	BD Pharmingen
CD25 APC-Cy7	1:25	PC61	BD Pharmingen
CD4 AF700	1:100	RM4-5	BD Pharmingen

2.6.4 Auswertung der Daten

Die Analyse wurde mit dem BDTM LSRII Durchflusszytometer (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) unter Verwendung des Programms FACSDiva (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) durchgeführt. Es wurden zwei Millionen Zellen gezählt. Die Auswertung der Daten erfolgte mit FlowJo (Tree Star Inc. 2010, Ashland, USA). Die Daten werden als Histogramm oder Dot Plot gezeigt und die Zahlen beziehen sich jeweils auf den prozentualen Anteil des vorher festgelegten Gates. Dabei wurden zunächst die Singlets ausgewählt, Doubleten und Triplets, die das Ergebnis verfälschen könnten, wurden ausgegattet. Mittels einer lebend/tot-Färbung wurden nachfolgend die toten Zellen von der Analyse ausgeschlossen. Als Kontrollen wurden die -1 Färbungen genutzt. Dabei wurden die jeweiligen

Zellen mit dem Antikörper-Panel gefärbt und jeweils eine Farbe weggelassen. So konnte man erkennen, welches die real positiven Zellfärbungen waren und Fehlinterpretationen ausschließen.

2.7 Molekularbiologische Analyse

2.7.1 qRT-PCR zur Bestimmung der Expression spezifischer Gene

Vorbereitung der Proben

Die für die PCR verwendeten Femora wurden etwa einen Millimeter rechts und links des Kallus im gesunden Knochen geschnitten und die Enden verworfen. Die entstandenen Stücke waren etwa 5mm groß. Der Kallus wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert. Nachfolgend wurde die RNA mittels TRIZOL (TRIzol Reagent, invitrogen, Darmstadt, Deutschland) isoliert.

Protokoll:

1. unter Kühlung mit flüssigem Stickstoff die Knochen mit einem Mörser pulverisieren
2. pulverisierten Knochen in 2ml Eppendorfgefäß überführen
3. auf 200mg Knochen 1ml TRIZOL
4. in 15 Sekunden Intervallen Gemisch homogenisieren (T10, Ultraturrax), auf Eis
5. 200µl Chloroform pro ml TRIZOL dazugeben
6. 15 Sekunden vortexen
7. 15 Minuten bei RT inkubieren
8. 15 Minuten bei 12,000x g zentrifugieren
9. nach der Phasentrennung die wässrige Phase mit der RNA abnehmen
10. 200µl Chloroform und 1ml TRIZOL dazugeben und die Schritte 7-9 wiederholen
11. 500µl Isopropanol pro ml TRIZOL (ursprüngliche Menge bei Homogenisieren) dazugeben und 10 Minuten bei RT inkubieren
12. bei 4°C für 10 Minuten zentrifugieren
13. Überstand verwerfen
14. Pellet mit 75% Ethanol waschen (1ml Ethanol pro ml TRIZOL)
15. 5 Minuten bei 7,500x g zentrifugieren
16. Waschschrift wiederholen
17. Pellet für 5-10 Minuten trocknen lassen
18. RNA in RNase freiem Wasser resuspendieren
19. Konzentration des RNA bestimmen bei 260 und 280 nm
20. Aufreinigung der RNA mit DNase I

Expressions-Analyse

Die Quantität der mRNA wurde mit einem Nanodrop-Gerät (Thermo Scientific, Bremen, Deutschland) getestet. 1 µg der RNA jedes Tieres wurde in cDNA (iScript Advanced cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR, BioRad, München, Deutschland) umgeschrieben und anschließend 3µl der cDNA einer PCR-Reaktion unterzogen. Die Primer für die PCR wurden über Exon-Intron Verbindungen gewählt und lagen zwischen 150-180 Basenpaaren. Sie wurden mit Primer3 (v.0.4.0) erstellt und ihre Sequenz mit Ensembl überprüft. Die Effizienz der Primer wurde vor der Analyse bestimmt (Tab. 7). Die bei der PCR neu entstehende DNA wurde während der gesamten PCR-Reaktion quantifiziert. Dies ist möglich, da ein Molekül (SYBR® Green, iQ SYBR Green Supermix, BioRad, München, Deutschland) an die doppelsträngige DNA bindet und fluoresziert. Die Fluoreszenz-Intensität nimmt mit der Menge der dsDNA zu. Dazu wurden ein PCR-Cycler und die Software IQ5 V 2.0 (BioRad, München, Deutschland) verwendet. Als Housekeeping Gen wurde Cyclophilin A, welches mittels gNorm Software ermittelt wurde, verwendet.

Tab. 7: Primersequenzliste

Gen	Primer	Primer-Sequenz	Basen-Länge	Effizienz
COL10	mCOL10a1(2) ase	5' CCA TTg Agg CCC TTA gTT gC 3'	20 mer	1,97
	mCOL10a1(2) se	5' ggC Agg TCC AAg Agg TgA AC 3'	20 mer	
COL1	mCOL1a1 ase	5' gTT CCA ggC AAT CCA CgA g 3'	19 mer	2,04
	mCOL1a1 se	5' ggT CCA CAA ggT TTC CAA gg 3'	20 mer	
CYA	mCYA ase	5' CTg gCA CAT gAA TCC Tgg AA 3'	20 mer	2,07
	mCYA se	5' CCA CCg TgT TCT TCg ACA TC 3'	20 mer	
OPG	mOPG ase	5' CTg CTC TgT ggT gAg gTT Cg 3'	20 mer	1,89
	mOPG se	5' AgC TgC TgA AgC TgT ggA AA 3'	20 mer	
RANKL	mRANKL ase	5' CgA AAg CAA ATg TTg gCg TA 3'	20 mer	1,90
	mRANKL se	5' gCA CAC CTC ACC ATC AAT gC 3'	20 mer	

PCR-Reaktionsansatz:

- iQ Supermix
- cDNA
- Primer 1
- Primer 2
- mit A. dest auf 20µl auffüllen

qRT-PCR-Reaktion:

- 2 Min. 50°C
- 10 Min. 95°C

- 15 Sek. 95°C
- 1 Min. 60°C
- beide Schritte für 45 Zyklen

- 15 Sek. 95°C
- 1 Min. 60°C
- 15 Sek. 95°C
- abkühlen auf 4°C

Auswertung

Es wurden 5 Tiere pro Tierstamm und Zeitpunkt untersucht. Die qRT-PCR Ansätze wurden in Triplikaten durchgeführt und die Expressionslevel auf das Housekeeping Gene Cyclophilin A, normalisiert. Je drei Wasserproben pro Ansatz wurden in der PCR mitgeführt um die Sauberkeit der PCR zu garantieren. Die Anzahl der RNA Transkripte wurde aus der Zahl der PCR-Zyklen kalkuliert, nach denen die Fluoreszenzkurve in eine exponentielle Kurve übergeht. Mit der $2^{-\Delta CT}$ Methode konnte die relative Genexpression zu einem bestimmten Untersuchungszeitpunkt zwischen den Versuchsgruppen analysiert werden.

2.7.2 Transkriptomanalyse für globale Genexpression in den Versuchstieren im Heilungsverlauf

Vorbereitung der Proben

Die Transkriptomanalyse wurde am Max-Planck Institut für Molekulare Genetik in Berlin Dahlem durchgeführt. Für die Transkriptomanalyse wurde dieselbe RNA verwendet wie für die qRT-PCR. Von der erhaltenen RNA wurden 600ng von den 5 Untersuchungstieren jeder Gruppe zusammengemischt und auf drei Eppendorfgefäße á 200ng verteilt. Die RNA wurde

für diese Analyse in eine cRNA umgeschrieben und markiert. Dafür wurde der Illumina TotalPrep RNA amplification kit (Ambion, Austin, Texas) verwendet und nach der beiliegenden Anleitung durchgeführt.

Durchführung des μ Arrays

Für die Transkriptomanalyse wurden Illumina's MouseRef-8 v2.0 Bead Chips (Ambion, Austin, Texas) verwendet. Nach der Markierung der RNA erfolgte die Hybridisierung der fragmentierten cRNA auf dem Chip, gefolgt von Färbung, Waschschritten und dem Einlesen des Chips nach den vorgegebenen Protokollen des Illumina Whole-Genome Gene Expression Direct Hybridizations Assays.

2.8 Zellbiologische Untersuchungen zur Analyse der Differenzierungskapazität der MSCs

Mesenchymale Stromazellen lassen sich charakteristischer Weise in 3 verschiedene Richtungen differenzieren. Dabei handelt es sich um die osteogene, adipogene und chondrogene Richtung. Um den Einfluss der RAG1^{-/-} Deletion auf das Proliferationsverhalten und das Differenzierungspotential zu untersuchen, wurden die MSCs aus dem Knochenmark isoliert und differenziert.

2.8.1 Gewinnung der Mesenchymalen Stromazellen (MSCs)

Die MSCs wurden aus den Femora sowohl der Wildtypen als auch der RAG1^{-/-} Mäuse isoliert. Dazu wurden die Femora entnommen und in steriles PBS überführt, um eine Austrocknung der Knochen zu verhindern und von noch anhaftenden Muskelresten befreit. Mit einer sterilen Schere wurden die Femora halbiert und mit dem geöffneten Bereich in eine sterile Pipettenspitze gesteckt. Die Pipettenspitze wurde in ein Eppendorfgefäß gebracht. Es erfolgte eine Zentrifugation (Hettich, Rotofix 32, Berlin, Deutschland) bei 1500 rpm für 3 Minuten. Durch die Zentrifugalkraft wurde das Knochenmark aus dem Knochen in das Eppendorfgefäß gedrückt. Die Pipettenspitze mit den Femora wurde verworfen und das Knochenmark in 500µl Expansionsmedium DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, 41965-039, Gibco, invitrogen, Darmstadt, Deutschland) mit 10% FCS (fötales Kälberserum, Biochrom, Berlin, Deutschland) und 1% Penicillin/Streptomycin (P/S, A2213, Biochrom, Berlin, Deutschland) resuspendiert.

2.8.2 Kultivierung der MSCs

Das Knochenmark dreier Mäuse wurde gepoolt und in eine 75cm² Zellkulturflasche gegeben. Es wurden nochmals 5 ml Expansionsmedium hinzugegeben, sodass ein feiner Film Medium den Boden der Zellkulturflasche bedeckte. Die Zellkulturflaschen wurden in CO₂ Inkubatoren (CB150, Binder GmbH, Deutschland) bei 37 °C inkubiert. Nach 2 Tagen wurde das Expansionsmedium abgesaugt und die adhärenen Zellen zweimal mit PBS (ohne Calcium/Magnesium, H15-002, PAA Laboratories, Österreich) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen bis zu einer Konfluenz von ca. 80% angezogen. Dabei wurde zweimal wöchentlich das Medium gewechselt und das Wachstum der Zellen mittels Mikroskop überprüft. Hatten die Zellen eine 80%ige Konfluenz erreicht, wurden sie mit Trypsin (Sigma) vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst, mit PBS (ohne Calcium/Magnesium) gewaschen, geteilt und in neue Zellkulturflaschen überführt.

2.8.3 Osteogener Differenzierungsassay

Nachdem genug Zellen für den Assay vorhanden waren, wurden die MSCs trypsiniert und mit dem CASY- Cell Counter (Model DT, Schäfe System, Reutlingen, Deutschland) gezählt. Die Differenzierung wurde in 24 Well Platten vorgenommen. $2,4 \times 10^4$ Zellen wurden pro Well ausgesät. Nach ca. 2-3 Tagen waren die Zellen konfluent. Zu diesem Zeitpunkt wurde das Expansionsmedium abgesaugt und je well 400µl Differenzierungsmedium dazugegeben. Das osteogene Differenzierungsmedium bestand zu je eingesetztem Milliliter aus 4µl Ascorbinsäurephosphat (A-8960, Sigma, Hamburg, Deutschland), 35µl β- Glycerolphosphat (35675, Calbiochem, Darmstadt, Deutschland), 10 µl wasserlöslichem Dexamethason (D2915, Sigma, Hamburg, Deutschland), 100µl FCS und 851µl DMEM+ P/S. Das Medium wurde zweimal wöchentlich gewechselt. Die Differenzierung erfolgte im Dreifachansatz. Um auszuschließen, dass eine spontane Differenzierung der MSCs in die osteogene Richtung erfolgt, wurden als Kontrolle auch MSC mit Expansionsmedium mitgeführt. Nach 16 und 21 Tagen wurden eine AlizarinRot S- und eine Von Kossa Färbung der differenzierten Zellen durchgeführt.

Alizarin Rot S- Färbung Färbeprotokoll:

- | | |
|---|------------|
| 1. Medium aus der 24- well Platte absaugen | |
| 2. 2x mit 500µl PBS waschen | 3 Minuten |
| 3. 300µl 4% PFA | 10 Minuten |
| 4. PFA absaugen | |
| 5. 2x mit 500µl PBS waschen | 3 Minuten |
| 6. 2x mit a. dest waschen | |
| 7. well mit 200µl 0,5% Alizarin Rot S überschichten, RT | 10 Minuten |
| 8. Färbelösung absaugen | |
| 9. 4x mit a. dest waschen | 5 Minuten |
| 10. Inkubation mit 200µl 10% Cetylpyridiniumchlorid | 10 Minuten |
| 11. 100µl der Lösung in 96 well Platte geben und im Elisareader bei $\lambda=562\text{nm}$ messen | |

Färbelösungen:

- 200mg Alizarin Red S in 40 ml H₂O lösen, pH 4 einstellen (Fluka, Hamburg, Deutschland)
- 10% Cetylpyridiniumchlorid in H₂O (Sigma, Hamburg, Deutschland)

Von Kossa Färbeprotokoll:

- | | |
|---|------------|
| 1. 2x Zellen mit 500µl PBS waschen | kurz |
| 2. mit 500µl kaltem EtOH (4°C) fixieren | 20 Minuten |
| 3. 3x mit 500µl Leitungswasser waschen | kurz |
| 4. 500µl 5% AgNO ₃ -Lösung, RT, Lichteinstrahlung! | 60 Minuten |
| 5. 3x mit 500µl Leitungswasser waschen | |
| 6. 500µl 1% Pyrogallussäurelösung, RT | 3 Minuten |
| 7. 3x mit 500µl Leitungswasser waschen | |
| 8. Fixierung mit 500µl 5% Natriumthiosulfatlösung, RT | 5 Minuten |
| 9. 3x mit 500µl Leitungswasser waschen | |
| 10. Gegenfärbung mit 500µl Kernechtrot, RT | 10 Minuten |
| 11. 2x mit 500µl Leitungswasser waschen | |

Färbelösungen:

- alle Lösungen in H₂O ansetzen

Die Ermittlung der Zellzahl erfolgt mittels MTS (Cell Titer 96® AQueous Cell Proliferation Assay, Promega, USA) Test. Dazu wurden 400µl einer MTS/PMS Lösung auf die Zellen gegeben und die Platte für 2 Stunden bei 37°C inkubiert. 120µl jedes Well wurden in eine 96 well Platte überführt und im Elisareader bei $\lambda=490\text{nm}$, gemessen. Das Ergebnis der Alizarin Rot S Färbung wurde anschließend auf die im MTS Test ermittelte Zellzahl normalisiert. Die Auswertung der Von Kossa Färbung erfolgt deskriptiv.

2.9 Statistik

Für die statistische Auswertung der Histomorphometrie und der qRT-PCR wurde der Mann Whitney U Test verwendet, da bei einer geringen Tierzahl pro Versuchsgruppe nicht von einer Normalverteilung der Ergebnisse ausgegangen werden konnte und nur die beiden Versuchsgruppen je Untersuchungszeitpunkt miteinander verglichen wurden. Dabei handelt es sich um einen nicht parametrischen Zwei-Stichproben Test mit unabhängigen Stichproben. Alle Versuchsgruppen wurden ausschließlich gegen den Wildtyp getestet. Auf eine Bonferroni-Holm-Korrektur konnte in diesem Zusammenhang verzichtet werden, da eine deskriptive Darstellung angestrebt wurde. Die statistische Auswertung erfolgte mit SPSS 18 (SPSS GmbH Software, München, Deutschland).

Die Ergebnisse der histologischen Untersuchungen (je 8Tiere/Zeitpunkt) und der qRT-PCR (je 5 Tiere/Zeitpunkt) wurden als Boxplot dargestellt. In dieser Darstellungsform war es möglich den Median (50% Quartil), sowie die 25%- und 75% Quartile und die Minimum- und Maximum-Werte zu erkennen. Der Boxplot selbst enthält den Median und wird vom 25% sowie vom 75% Quartil eingegrenzt. Der Körper des Boxplots umfasst somit 50% der Ergebnisse. An diesen Körper schließen sich T-förmige Whiskers an. Sie umfassen zum Einen die Werte unter dem 25% Quartil und zum Anderen die Werte über dem 75% Quartil. Ausreißer sind über oder unter dem Boxplot als Kreis gekennzeichnet.

Ein Strich mit darüber liegendem Sternchen stellt im Boxplot einen Unterschied $p<0,05$ zwischen den Versuchsgruppen dar. Ein Trend wurde mit einem Strich und darüber liegender Raute dargestellt.

Die histologischen Daten der Movat Pentachrom Färbung in den JHT^{-/-} und beta-delta Tieren (je 8 Tiere pro Versuchsgruppe) wurde mit den Ergebnissen des WT und der RAG1^{-/-} Tiere verglichen. Hierfür wurde der einfaktorielle ANOVA Test verwendet und eine Bonferroni-

Holm Korrektur durchgeführt um alle vier Versuchsgruppen an Tag 7 miteinander vergleichen zu können. Bei einem festgelegten Signifikanzniveau α von 5% liegt ein signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen vor. Die Irrtumswahrscheinlichkeit liegt bei 0,05. Die erhaltenen Daten wurden in einem Boxplot dargestellt. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen wurde mit einem Strich und einem darüber befindlichen Sternchen markiert.

Für die Statistik der Transkriptomanalyse wurde Limma für die Bildung der Mittelwerte der Replikate verwendet. Anschließend wurde ein zwei seitiger T-Test für einen Vergleich zwischen zwei Versuchsgruppen durchgeführt. Die p-Werte wurden mit der Benjamini-Hochburg Methode korrigiert. Die Daten wurden in einer sogenannten Heatmap dargestellt, wobei jede Spalte einen Zeitpunkt, sowie eine Versuchsgruppe repräsentiert. Ein Gen wurde als signifikant unterschiedlich exprimiert angesehen, wenn es mit der Benjamini-Hochburg Methode einen p-Wert kleiner 0,01 und einen Foldchange von $|2|$ besaß. Die funktionelle Annotation wurde über die Datenbank von DAVID Bioinformatics vorgenommen. Es wurde eine GO FAT Analyse für Genontologien für biologische Prozesse, zelluläre Komponenten und molekulare Funktionen gewählt.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung von Knochenmark, Milz und Blut in WT und RAG1^{-/-} Mäusen zur Validierung des Mausmodells

Die Untersuchung der nativen Knochen erfolgte, um eventuelle bereits vor der Fraktur vorhandene Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen zu erkennen und zu verdeutlichen. Hierbei sollten die Unterschiede der zellulären Zusammensetzung von Immunzellen und Knochenzellen herausgestellt werden.

In Knochenmark, Milz und Blut der RAG1^{-/-} Tiere gibt es keine reifen B- und T-Lymphozyten

Die FACS Analyse wurde durchgeführt um den Anteil der Lymphozyten in Knochenmark, Milz und Blut zu bestimmen. Ebenso diente diese Methode zur Überprüfung der RAG1 Mutation. Reife Lymphozyten sollten in diesen Tieren nicht nachgewiesen werden.

Wie in Abbildung 11 ersichtlich wird, waren im Knochenmark der WT Tiere etwa 3% der isolierten Zellen T-Lymphozyten. Die davon bestimmten CD4 und CD8 positiven Subpopulationen waren mit 35% für CD4 und 40% für CD8 etwa gleich groß. Nicht dargestellt sind die Werte für die Untersuchungen der Milz und des Bluts. In der Milz der Tiere wurden 31,5% CD3 positive Zellen gefunden, im Blut war es mit 30% eine minimal kleinere Population.

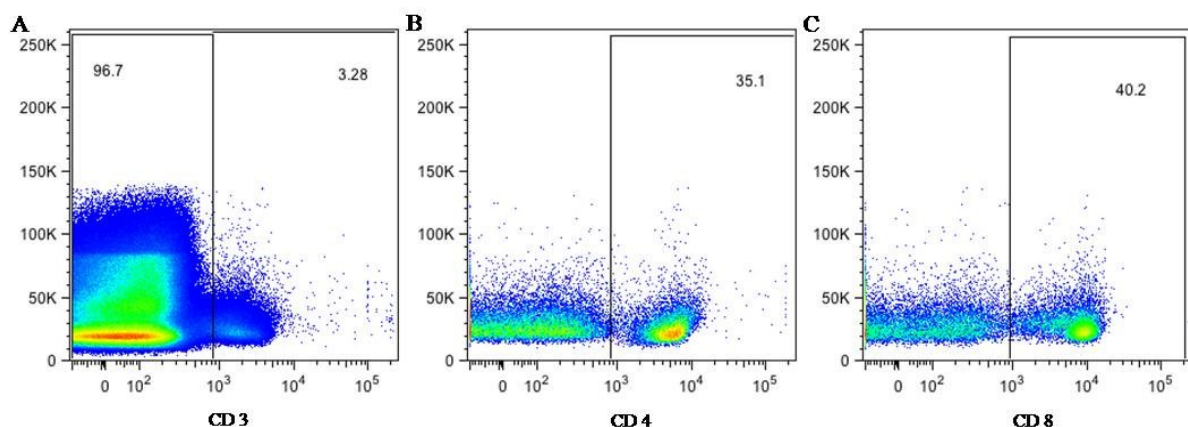


Abb. 11: FACS Analyse des Knochenmarks im WT. Die CD3 positiven Zellen sind in Teil A dargestellt. Davon wurden die CD4 positiven Zellen (B) und CD8 positiven Zellen (C) ermittelt. Auf der X-Achse ist das gefärbte Antigen ersichtlich und auf der Y-Achse der SSC. Positive und negative Zellen wurden gegatet und sind mittels des Kastens dargestellt. Die prozentuale Anzahl der Zellen ist im Plot angegeben.

Im Knochenmark der RAG1^{-/-} Tiere konnten keine T-Lymphozyten nachgewiesen werden. Alle detektierten Zellen waren negativ für das Oberflächenantigen CD3 (Abb. 12 C). Rund 8% der isolierten Zellen waren jedoch B220 positiv (Abb. 12 A). Dabei handelt es sich um einen Oberflächenmarker, der sehr früh in der Entwicklungsphase von B-Zellen auftritt. Da die meisten dieser Zellen aber negativ für CD25 waren, handelte es sich dabei um naive Zellen, die die RAG1^{-/-} Maus durchaus noch entwickelt.

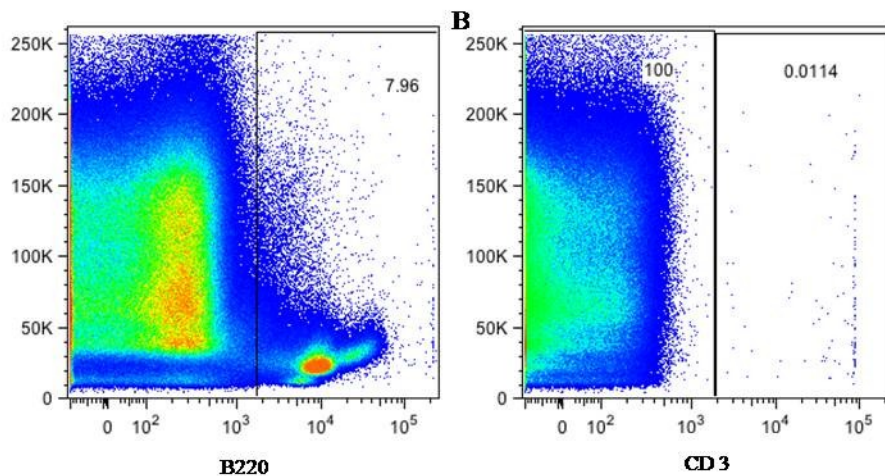


Abb. 12: FACS Analyse des Knochenmarks im RAG1^{-/-} Tier. Die B220 positiven Zellen sind in Teil A dargestellt. Teil B zeigt den Anteil der CD3 positiven Zellen. Auf der X-Achse ist das gefärbte Antigen ersichtlich und auf der Y-Achse der SSC. Positive und negative Zellen wurden gegatet und sind mittels des Kastens dargestellt. Die prozentuale Anzahl der Zellen ist im Plot angegeben

Auch in der Milz und im Blut der Mutante konnten B220 positive Zellen gefunden werden (Abb. 13). Es waren mit 23% im Blut und 13% in der Milz mehr Zellen als im Knochenmark. Aber auch hier handelte es sich um CD25 negative Zellen (nicht dargestellt). CD3 positive Zellen konnten in beiden Organen nicht nachgewiesen werden. Damit konnte gezeigt werden, dass in den verwendeten RAG1^{-/-} Tieren keine reifen B- und T-Lymphozyten vorlagen.

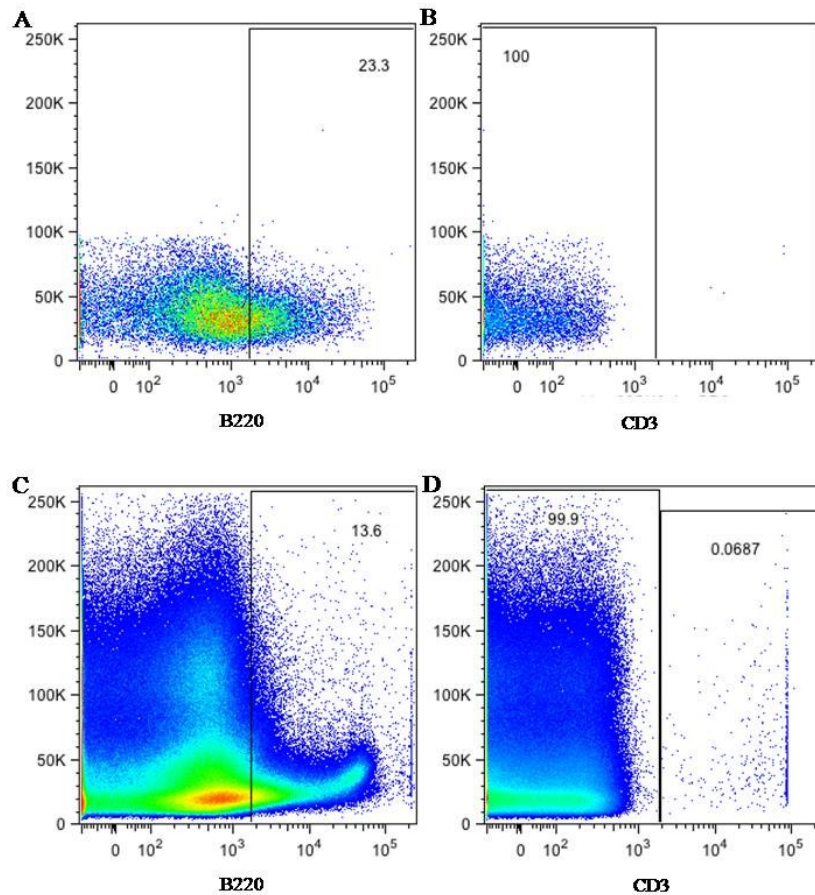


Abb. 13: FACS Analyse des Bluts und der Milz im RAG1^{-/-} Tier. Dargestellt sind die B220 positiven Zellen des Bluts (A) und der Milz (C), sowie die CD3 positiven Zellen aus Blut (B) und Milz (D). Auf der X-Achse ist das gefärbte Antigen ersichtlich und auf der Y-Achse der SSC. Positive und negative Zellen wurden gegatet und sind mittels des Kastens dargestellt. Die prozentuale Anzahl der Zellen ist im Plot angegeben

Unterschiedliche Osteoblasten- und Osteoklastenzahlen in WT und Mutante

Für diese Untersuchung wurden die Femora der Tiere entnommen und in Kryo-Medium eingebettet. Es wurden mit der Methode nach Kawamoto 7µm dicke Schnitte angefertigt und mit verschiedenen Antikörpern Oberflächenmarker von Immun- und Knochenzellen spezifisch angefärbt.

Für den Nachweis von B-Lymphozyten wurde der allgemeine B-Zellmarker B220 verwendet. Um die Lymphozyten genauer zu unterteilen, wurde zusätzlich eine Anfärbung der konstanten Kette ihres Immunglobulins vorgenommen. Es wurden IgM, IgD und IgG angefärbt.

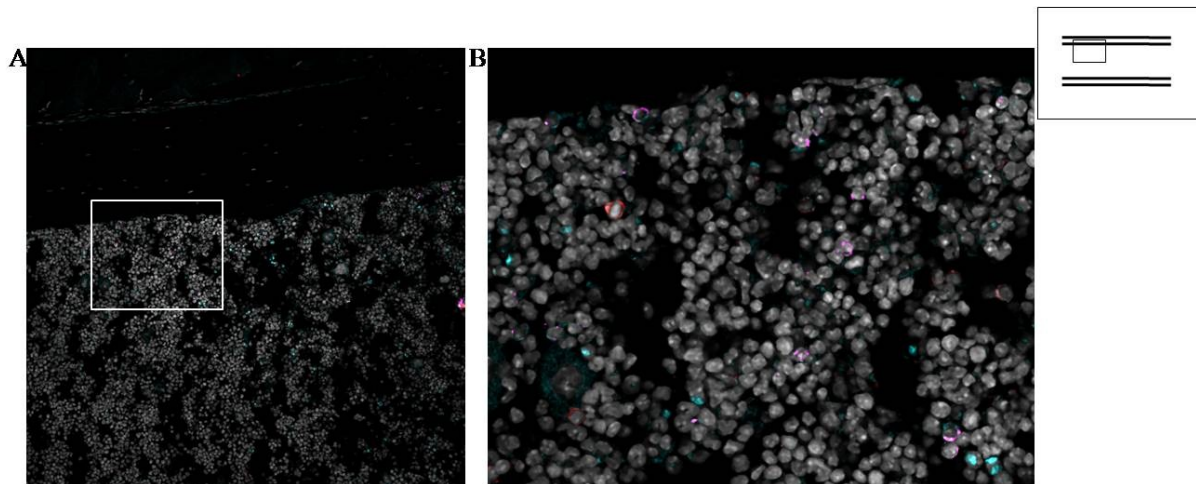


Abb. 14: Färbung der B-Lymphozyten im Wildtyp Tier. Es ist deutlich zu erkennen, dass B-Lymphozyten im Knochenmark des intakten Femurs vorkommen und diese unterschiedliche Immunglobulin-Arten exprimieren (A). Das rechte Bild (B) zeigt einen vergrößerten Ausschnitt aus der linken Abbildung, B220, IgM, IgD, IgG aus dem Knochenmark des WT. Der mit dem Mikroskop aufgenommene Bereich des Knochens in Abbildung A und seine Lage im Femur sind oben rechts schematisch dargestellt. Dabei handelt es sich um den diaphysären Bereich des Femurs, die Knochenenden sind nicht dargestellt.

Wie in der Abbildung 14 zu erkennen, befanden sich im Knochenmark der Wildtyp Tiere viele B-Lymphozyten. Alle markierten B-Zellen waren positiv für den Oberflächenmarker B220. Vereinzelt konnten im Knochenmark der nativen Tiere B220, IgM und IgD positive Zellen gefunden werden. Dabei handelte es sich um unreife B-Lymphozyten, die noch nicht durch ein Antigen aktiviert wurden und damit einhergehend noch keinen Klassenwechsel der konstanten Region ihres Immunglobulins vollzogen haben. Die überwiegende Anzahl der B-Lymphozyten war B220⁺ IgM⁺. Diese Zellen wurden bereits aktiviert und haben einen Klassenwechsel vollzogen. Sie exprimierten den für naive B-Lymphozyten charakteristischen IgD Marker nicht mehr. IgG positive Zellen konnten im gesamten Knochenmarksraum nicht gefunden werden. In den RAG1^{-/-} Tieren wurde diese Ig-spezifische Färbung der B-Lymphozyten nicht durchgeführt, da sie keine reifen B- und T-Lymphozyten besitzen. Eine Unterscheidung einzelner B-Lymphozyten Populationen war nicht notwendig. Der Marker B220 wurde aber in den nachfolgenden Färbungen auch im RAG1^{-/-} Tier mitgeführt, um diesen Umstand nachzuweisen.

Zusätzlich zu den B-Lymphozyten wurde eine Färbung zum Nachweis der T-Lymphozyten durchgeführt. Dabei wurde der Oberflächenmarker CD3 genutzt, welchen alle T-Lymphozyten besitzen. T-Lymphozyten unterscheiden sich in zwei große Untereinheiten die CD4 positiven T-Helferzellen und die CD8 positiven zytotoxischen T-Zellen. Um die Verteilung dieser beiden Populationen im Knochenmark zu testen, wurde zusätzlich zu CD3 auch CD4 ange-färbt. Die CD3 positiven und CD4 negativen Zellen, entsprachen den zytotoxischen T-Zellen.

Des Weiteren wurde in dieser Mehrfachfärbung Laminin gefärbt. Dabei handelt es sich um ein Glykoprotein, welches Netzwerke zwischen Zellen ausbildet und so Zellen und Gewebe zusammen hält.

In Abbildung 15 A handelt es sich um die Anfärbung der vorher genannten Marker im Wildtyp, eine Vergrößerung ist in Bild C zu erkennen. Es war zu erkennen, dass B- und T-Lymphozyten dicht nebeneinander vorkamen, die B-Lymphozytenzahl aber höher war, als die Anzahl an T-Lymphozyten. Die Anzahl der CD4 positiven Zellen überstieg die der CD8 positiven T-Lymphozyten. Vereinzelt waren Lamininstrukturen im Knochenmark der Wildtypen zu erkennen.

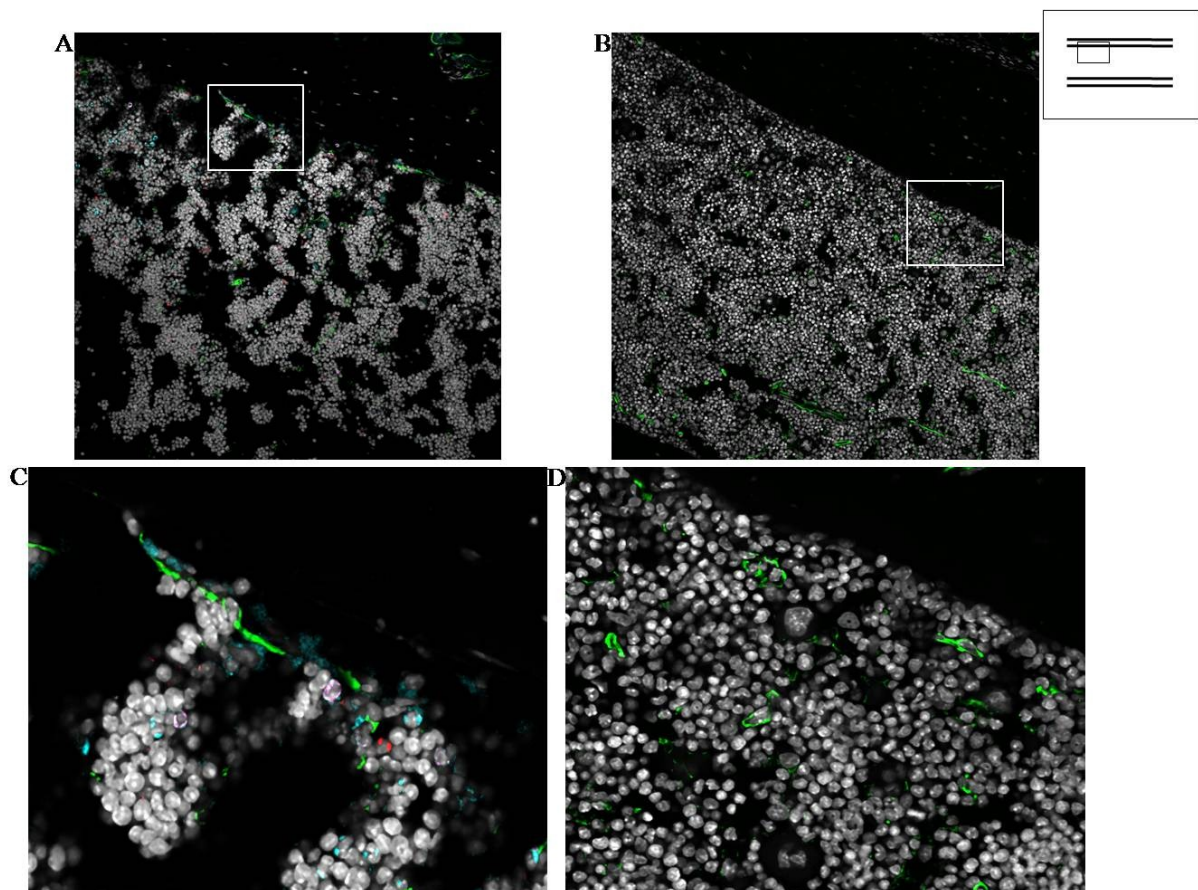


Abb. 15: Darstellung der T-Lymphozyten im WT (A,C) und im RAG1^{-/-} Tier (B,D). Bei den Teilbildern C und D handelt es sich jeweils um eine Vergrößerung des darüber liegenden Bildes. Deutliche Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen sind erkennbar. B220, CD3, CD4, Laminin. In der Mutante sind keine T-Lymphozyten zu erkennen und die Lamininstrukturen sind deutlich stärker ausgeprägt.

In den RAG1^{-/-} Tieren hingegen konnten im gesamten Knochenmarksraum weder B220 noch CD3 positive Zellen gefunden werden. Dies bestätigte, die in der Literatur genannten Befunde, dass diese Tiere keine reifen B- und T-Lymphozyten besitzen. Das Stromnetzwerk war in

diesen Tieren jedoch deutlicher ausgeprägt, was man an den vermehrt auftretenden Lamininanfärbungen sehen konnte.

Um Osteoblasten und ihre räumliche Lage zu den Immunzellen zu untersuchen wurden Schnitte zusätzlich zu B220 und CD 3 mit Osteokalzin, einem Osteoblasten-spezifischen Marker angefärbt (Abb. 16).

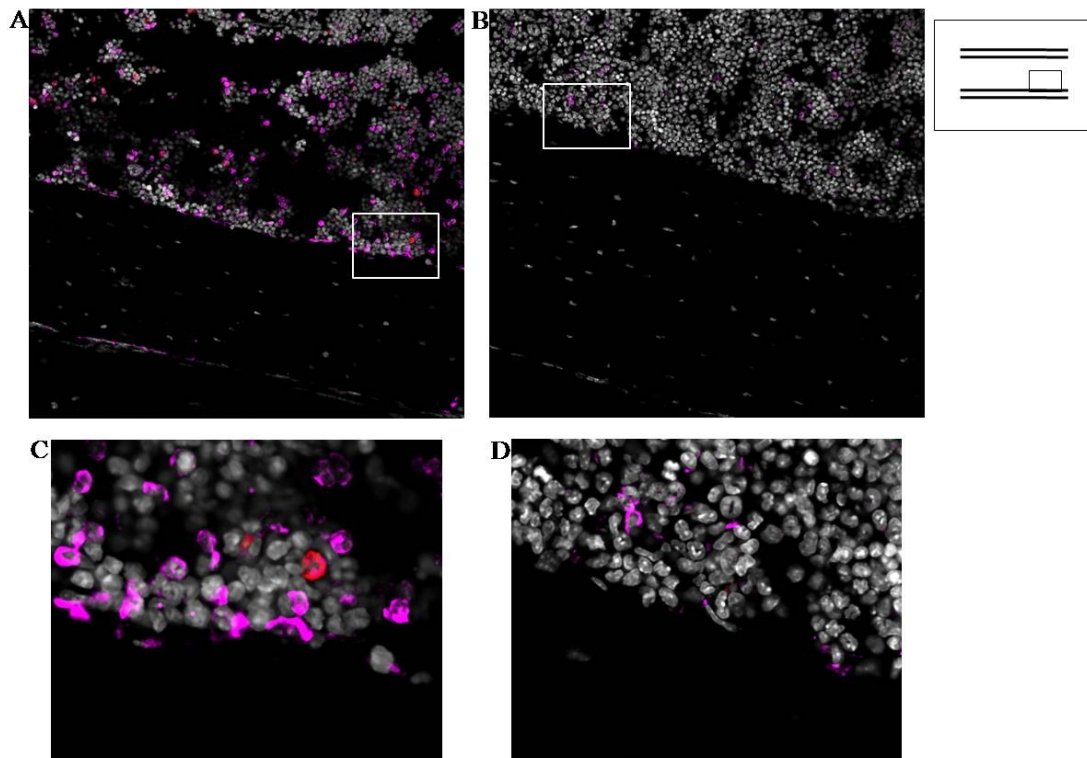


Abb. 16: Anfärbung der Schnitte mit Osteokalzin, B220, CD3 und einem Marker für eosinophile Granulozyten in WT (A,B) und in der Mutante (C,D). Im WT waren deutlich mehr Osteokalzin positive Osteoblasten zu erkennen, die über den gesamten Markraum verteilt waren, wohingegen in den $RAG1^{-/-}$ Tieren die Zahl der Osteoblasten geringer ausfiel.

Es war ein deutlicher Unterschied in der Zahl der Osteoblasten zwischen beiden Tierstämmen zu erkennen. Die WT Tiere hatten deutlich mehr Osteoblasten, die zum Teil palisadenartige Strukturen am Knochen bildeten. Viele Vorläufer-Zellen konnten beobachtet werden. Um diese Zellen herum fanden sich viele B220 positive Zellen. In der Mutante hingegen waren kaum Osteoblasten an der Kortikalis zu erkennen. Sie wiesen auch keine Palisadenstruktur auf. Vereinzelt waren in den Wildtypen eosinophile Granulozyten zwischen den Osteoblasten. In der Mutante wurden weder B- noch T-Lymphozyten und auch keine eosinophile Granulozyten gefunden.

Auch die Osteoklasten und ihre Lage zu den Immunzellen wurde mittels Immunofluoreszenz überprüft. Zusätzlich wurden in diesem Schnitt Makrophagen angefärbt (Abb. 17).

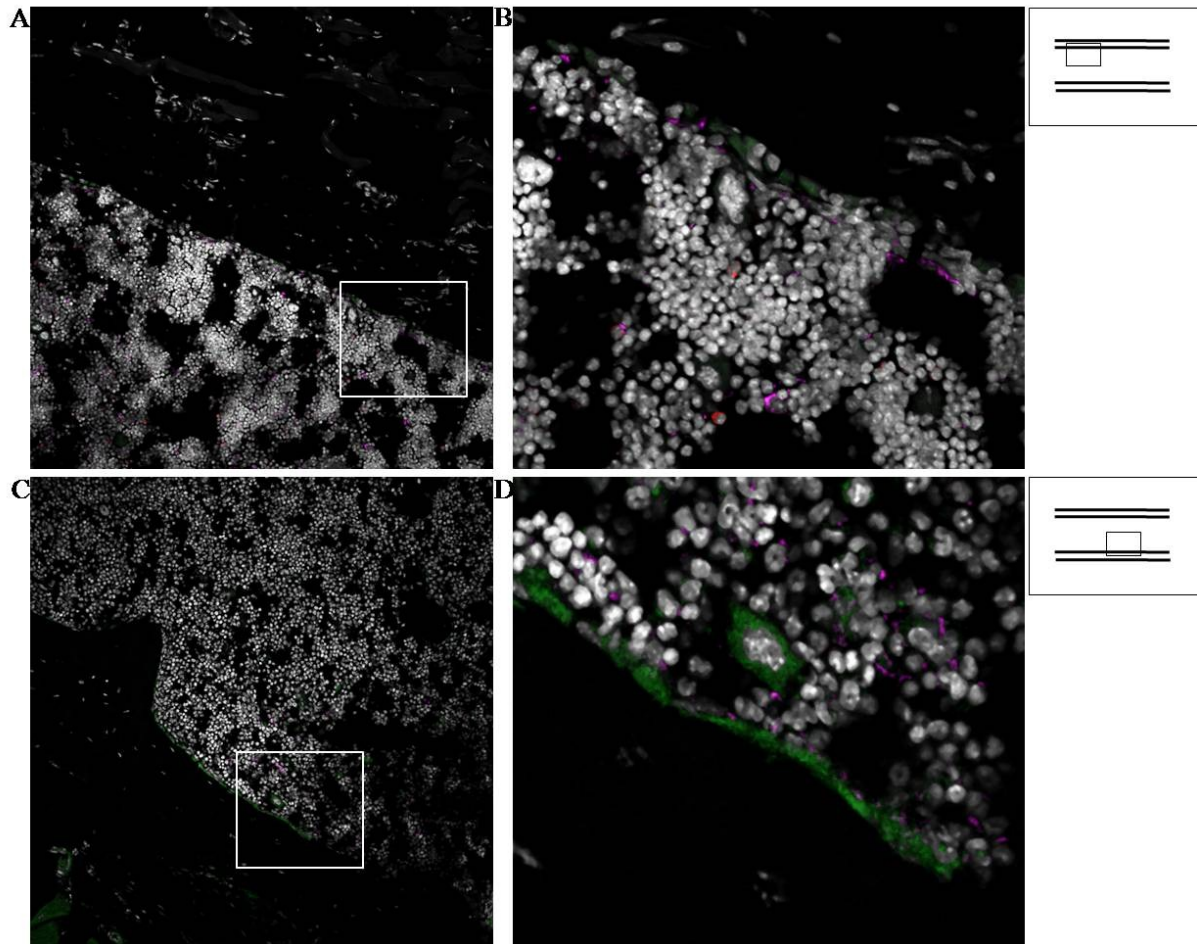


Abb. 17: Osteoklastenfärbung im WT (A,B) und im $RAG1^{-/-}$ (C,D). Angefärbt wurden die Oberflächenantigene B220, CD3, Kathepsin K und F4/80. Im WT waren deutlich weniger Osteoklasten zu finden. Sie waren über den gesamten Markraum verteilt. In den $RAG1^{-/-}$ Tieren hingegen waren mehr Kathepsin K positive Zellen zu erkennen, die fast die gesamte Oberfläche der Kortizes bedeckten.

In den Wildtyp Tieren konnte man nur wenige Osteoklasten an den Kortizes erkennen, auch im Knochenmarksraum fanden sie sich kaum. Vereinzelt konnten an den Kortizes und im Knochenmark Makrophagen gefunden werden. B- und T-Lymphozyten waren über das gesamte Knochenmark verteilt, wobei der Anteil an B-Zellen etwa doppelt so hoch war. In der Mutante waren die Osteoklasten sehr gut an den Kortizes zu erkennen und verliefen hier wie nebeneinander aufgereiht. Im Knochenmark wurden genauso wie im WT nur wenige Osteoklasten gefunden

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die $RAG1^{-/-}$ Tiere keine reifen B- und T-Lymphozyten besaßen und das Tiermodell für die nachfolgenden Untersuchungen geeignet war. Im Wildtyp dagegen kamen viele dieser Lymphozyten im Knochenmark des gesunden Knochens vor und der Anteil an B-Lymphozyten war höher als der Anteil der T-Lymphozyten. Die Lamininstruktur und damit die Netzwerkstruktur zwischen den Zellen war in der Mutante deutlicher ausgeprägt. Diese Tiere verfügten über mehr Osteoklasten als die Wildtypen, wohingegen dieser mehr Osteoblasten aufwies.

3.2 Histologische Analyse

3.2.1 In der deskriptiven Analyse zeigte sich eine frühere Verknöcherung der Chondrozyten in der Mutante

Diese Methode diente der genauen und detaillierten Beschreibung des Heilungsverlaufes an den 5 Untersuchungszeitpunkten. Je Untersuchungszeitpunkt gingen 8 Tiere des Wildtypstamms und 8 Tiere des Lymphozyten defizienten Stammes in die Auswertung ein. Hierzu wurden longitudinale 6µm dicke Paraffinschnitte der Femora angefertigt und mittels der Movat Pentachrom Färbung gefärbt. Dabei zeigten sich knorpelige nicht mineralisierte Bereiche in grün-türkis, verknöcherte Bereiche in gelb, Knochenmark in braun und das Muskelgewebe in rötlich- orange. Betrachtet wurden alle vier nach der Fraktur entstandenen Frakturrenden und das ihnen anliegende Gewebe, sowie die Verschiebung dieser zueinander.

Drei Tage post OP

An Tag 3 nach der Fraktur waren die Kortizes der WT Tiere selbst zumeist noch kompakt und glatt, lediglich in einem Tier konnte eine leichte beginnende Resorption an einer der Kortizes gefunden werden. Ein deutlicher Kallus war bei keinem der Tiere zu erkennen. Bei 7 von 8 Tieren konnte an einer oder zwei der Kortizes eine beginnende Kallusbildung beobachtet werden. Diese begann zunächst spaltfern und zeigte sich in einer leichten Geflechtknochenbildung an den jeweiligen Knochenrändern. Frakturspalt nah dominierten Bindegewebe und Hämatom. Es waren einzelne Entzündungszellen zu erkennen.

Auch in den $RAG1^{-/-}$ Tieren konnten hauptsächlich glatte und kompakte Frakturrenden beobachtet werden, jedoch zeigten einige Kortizes bereits eine Auflockerung. Im Gegensatz zum Wildtyp fand in diesem Mausmodell an allen Kortizes periostal spaltfern eine Kallus-

bildung statt. Es zeigte sich eine dezente Geflechtknochenbildung, die bei einigen Tieren auch endostal zu beobachten war. Die Bildung kleiner Inseln hyalinen Knorpels war sichtbar. Spaltnah befand sich fast ausschließlich Hämatom (Abb.18).

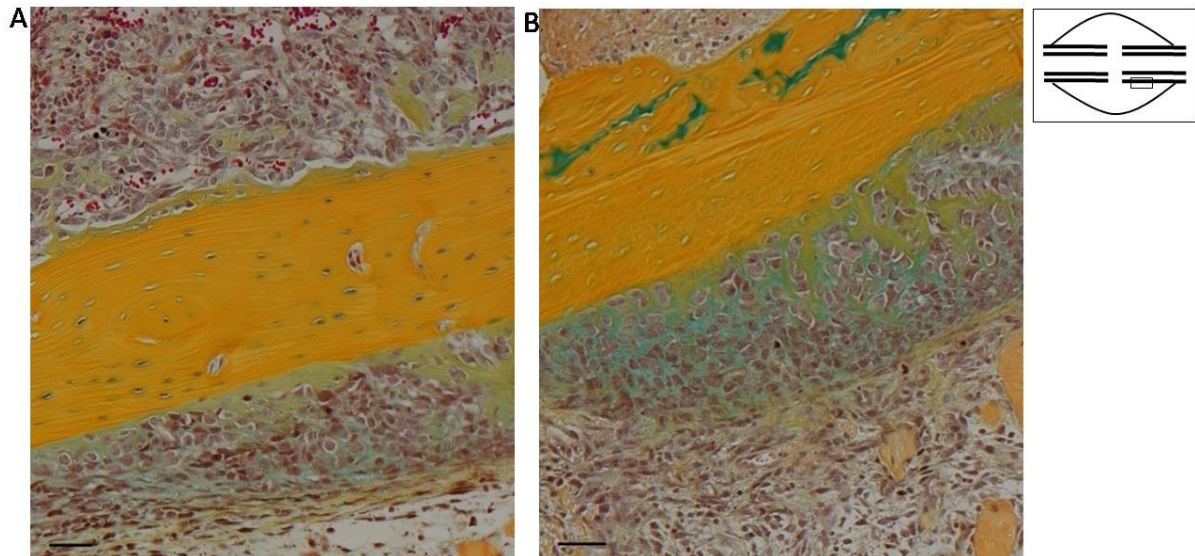


Abb. 18: Geflechtknochenbildung an den Kortizes: Auf diesen Bildern ist an den gelblich grünen Bereichen an den jeweiligen Kortizes deutlich zu erkennen, dass die Geflechtknochenbildung in den Wildtypen (A) noch nicht so weit fortgeschritten ist wie in den $RAG1^{-/-}$ Tieren (B). In der Mutante ist der gelblich grüne Bereich bereits größer. Maßstab = 50µm

Im histologischen Bild zeigten sich verschiedene Verschiebungen der Kortizes zueinander. Sieben der WT Tiere wiesen eine mittlere Verschiebung der Kortikalisenden auf. Dabei standen sich die Frakturenenden nicht genau gegenüber, sondern die proximalen oder distalen Frakturenenden hatten sich um etwa 25% zueinander verschoben. Bei einem Tier zeigte sich eine starke Verschiebung, sodass sich medial distaler und lateral proximaler Kortex fast gegenüberstanden.

Im $RAG1^{-/-}$ knockout Modell zeigte sich eine geringere Verschiebung der Frakturenenden. In 5 der Tiere standen sich die Frakturenenden genau gegenüber, in 2 Tieren gab es eine mittlere Verschiebung der Kortizes.

Tag 7 post OP

Die Kortizes aller WT Tiere hatten weiterhin eine kompakte Struktur, wiesen aber zunehmend Bereiche an den Kortizes auf, die einer Resorption unterlagen. Hierbei zeigten die Kortizes eine wellenförmige Struktur. Zusätzlich konnte in allen Tieren das Auftreten eines großen Kallus beobachtet werden. Dieser setzte sich zumeist aus proliferierendem und hypertrophem

Knorpel zusammen. Das Verhältnis zwischen beiden Korpeltypen lag bei etwa 1:1. Kleinere Teile des hypertrophen Knorpels waren bereits verknöchert. Periostal setzte sich der Kallus aus einem großen Knorpelbereich, einem kleineren Teil Bindegewebe und an den distalen und proximalen Enden des Kallus aus noch unreifem Geflechtknochen zusammen. An diesem neu gebildeten Geflechtknochen konnten viele Osteoblasten in ihrer typisch palisadenartig angeordneten Struktur beobachtet werden. Das Hämatom befand sich zumeist ausschließlich im endostalen Bereich. Nur vereinzelt waren kleinste Hämatomreste im periostalen Kallus erkennbar (Abb. 19 A).

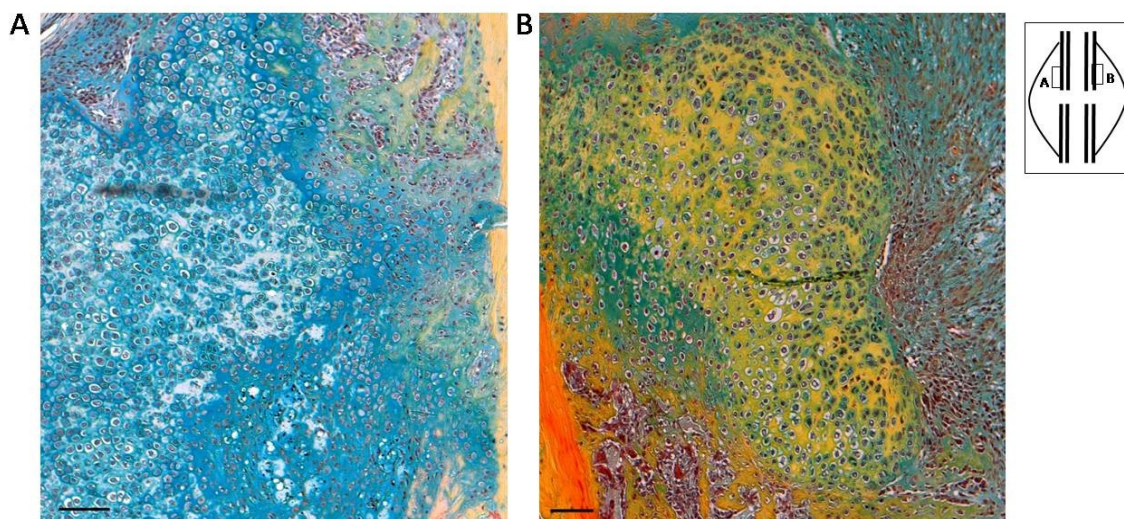


Abb. 19: Chondrozyten im Kallus: Es ist deutlich zu erkennen, dass es in beiden Versuchsgruppen zu einer Kallusbildung gekommen ist. Der Kallus des WT (A) setzt sich aus proliferierenden und hypertrophen Chondrozyten (blasige Zellen) zusammen. Eine Verknöcherung ist kaum zu erkennen. Hingegen sieht man die Ossifikation der Chondrozyten in der Mutante (B) deutlich (gelb). Maßstab = 100µm

Die Kortizes zeigten sich in den $RAG1^{-/-}$ Tieren weniger kompakt als im Wildtyp zum gleichen Zeitpunkt. Die Kortizes der Tiere waren zumeist aufgelockert und wirkten durch Resorption und Auflagerung neuen Geflechtknochens unruhiger. Es konnte lediglich bei einem Tier eine knorpelige Überbrückung des Frakturspalts beobachtet werden. Die Kallusgröße unterschied sich in der Mutante nicht vom Kallus des Wildtyps. Im Gegensatz zum Wildtyp bestand der Kallus in den $RAG1^{-/-}$ Versuchstieren jedoch fast ausschließlich aus hypertrophen Chondrozyten, von denen große Teile bereits verknöchert waren. Die Verknöcherung setzte allerdings nicht direkt am Frakturspalt ein, sondern es kristallisierten sich 4 runde Bereiche, an der periostalen Seite jeder Kortize, heraus. Die an Tag 3 nach der Fraktur beobachtete Geflechtknochensynthese setzte sich in Richtung Frakturspalt fort. Hämatomreste konnten endostal noch gefunden werden (Abb. 19 B).

Zu diesem Zeitpunkt gab es 3 WT Tiere die eine starke Verschiebung der Frakturenden aufwiesen. Bei den Lymphozyten defizienten Tiere zeigten 5 Tiere eine mittlere Verschiebung und es gab 3 Tiere, bei denen sich die Frakturenden gegenüberstanden. Eine repräsentative Kallusansicht beider Versuchsgruppen ist in Abbildung 20 dargestellt.

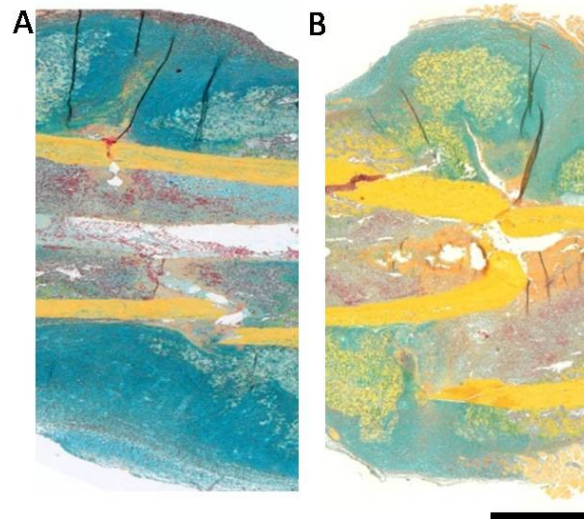


Abb. 20: Übersicht über die im Kallus vorliegenden Gewebeanteile im WT (A) oder in den RAG1^{-/-} Tieren (B). Im Kallus der WT Tiere sind neben proliferierenden Chondrozyten auch hypertrophe Chondrozyten zu erkennen. In den RAG1^{-/-} Tieren sind diese hypertrophen Chondrozyten zumeist schon verknöchert. Knochen gelb, Knorpel türkis. Maßstab = 2mm

Tag 14 post OP

Die Kortizes beider Versuchsgruppen wurden zunehmend aufgelockerter und stärker resorbiert. Dieser Prozess war in den RAG1^{-/-} Tieren etwas weiter fortgeschritten. Doch auch im WT nahm die Resorption stark zu. In beiden Gruppen stieg das Kallusvolumen zum Tag 14 noch an.

In den WT Tieren wurde nur noch wenig Knorpel gefunden (Abb. 21A, 22A). Die noch vorhandenen Knorpelbereiche waren im lateralen Kallus jedoch immer größer als im medialen Teil. Endostal konnte im Gegensatz zum periostalen Bereich eine leichte Zunahme des Knorpels beobachtet werden. Insgesamt bestand der Knorpel meist aus hypertrophen Chondrozyten. Auch zwischen Tag 7 und 14 hat sich die Geflechtknochensynthese fortgesetzt, wobei der neu gebildete Knochen immer kompaktere Strukturen aufwies und sich zwischen den neuen Geflechtknocheninseln Knochenmark bildete. Endostal war die Bildung von Geflechtknochen noch nicht so stark ausgeprägt und es befanden sich immer noch Hämatomreste im Frakturspalt.

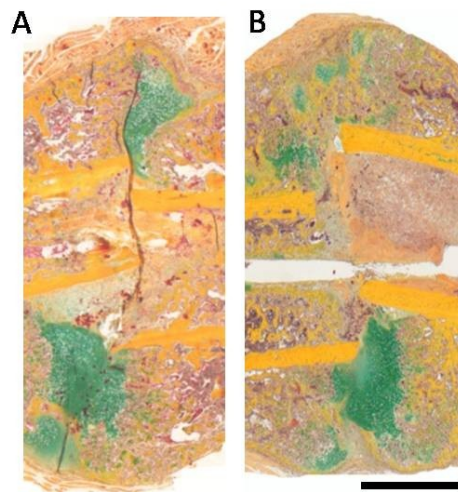


Abb. 21: Repräsentative Darstellung der Frakturkallus an Tag 14 der Frakturheilung in den Tieren des WT (A) und den Mutanten (B). Der Kallus der Mutanten zeigte größere verknöcherte Bereiche und weniger Knorpel verglichen mit den Tieren des WT. Maßstab = 2mm

In den knockout Tieren reichte der periostale Kallus nun teilweise bis in den Spalt hinein und es waren nur minimale Hämatomreste an den Frakturrenden vorhanden. Auch bei diesen Tieren befand sich medial immer mehr Knorpel als lateral. Jedoch war der Knorpel in diesen Tieren nur noch ein sehr schmales Band aus hypertrophen Chondrozyten, das sich vom Frakturspalt bis an den Kallusrand zog (Abb. 21B, 22 B). Bei 2 Tieren konnten keine Knorpelreste im Kallus gefunden werden. Der Kallus der Lymphozyten defizienten Tiere erschien generell reifer. Er war bis auf kleine Lücken schon fast vollständig knöchern überbrückt, während sich im WT noch Knorpelreste an der Außenseite des Kallus befanden. Der Kallus bestand fast ausschließlich aus Geflechtknochen, der zunehmend kompakter wurde. Auch zwischen diesen Bereichen befand sich Knochenmark in dem sowohl palisadenförmig angeordnete Osteoblasten und als auch die resorbierenden Osteoklasten zu finden waren.

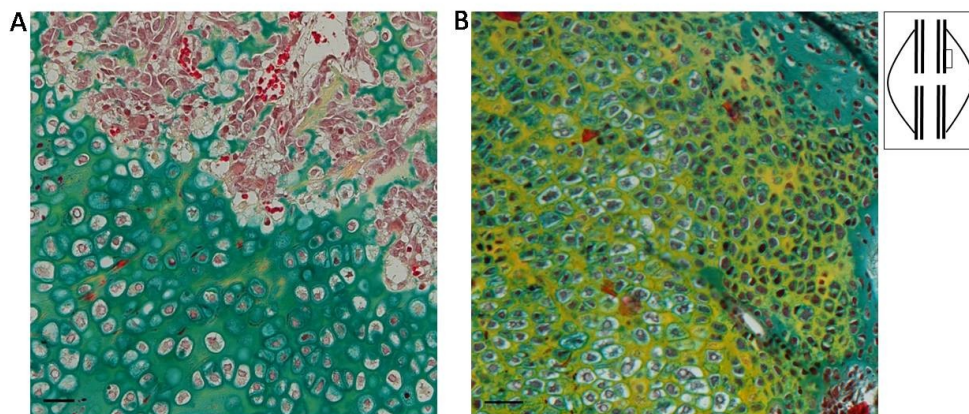


Abb. 22: Kallus an Tag 14: Die Ossifikation hat zu diesem Zeitpunkt auch im WT (A) eingesetzt und es sind fast ausschließlich hypertrophe Chondrozyten erkennbar. In den RAG1^{-/-} Tieren ist bereits fast die gesamte Knorpelmatrix verknöchert (gelbe Färbung). Maßstab = 50µm

Tag 21 post OP

Zwischen Tag 14 und 21 nach Fraktur kam es bei beiden Versuchsgruppen zu einer Abnahme des Kallusvolumens.

Im Kallus der WT Tiere konnten kleinste knorpelige Bereiche beobachtet werden, die sich aber ausschließlich im Spaltbereich befanden (Abb. 23A). Der Rest des Kallus bestand aus noch nicht vollständig verknöchertem Geflechtknochen und Knochenmark. Der Kallus war jedoch auch zu diesem Zeitpunkt noch nicht vollständig knöchern überbrückt. Es gab 2 Tiere, bei denen es zu einer Überbrückung von 2 der 4 Kortizes kam.

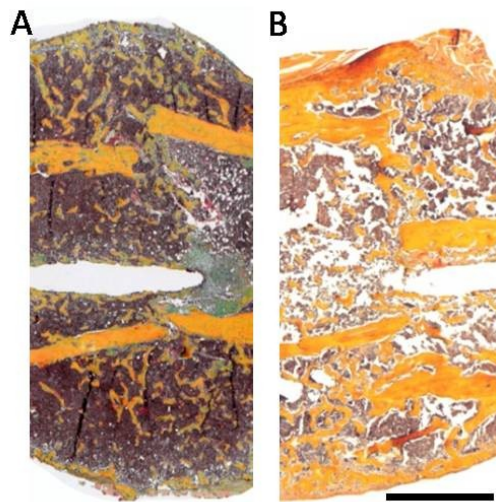


Abb. 23: Darstellung der Kallus am Tag 21 der Frakturheilung im WT (A) und der Mutante (B). In den Tieren des WT hat bis zu diesem Zeitpunkt noch keine knöcherne Überbrückung des Frakturspalts stattgefunden. In den $RAG1^{-/-}$ Tieren war der Frakturkallus bereits knöchern überbrückt. Maßstab = 2mm

Die Kortizes in den $RAG1^{-/-}$ Tieren waren teilweise sehr stark resorbiert und kaum noch als solche zu erkennen. Der Geflechtknochen war gleichmäßig über den gesamten Kallus verteilt und wies kaum grüne Bereiche auf (Abb. 23B).

Tag 28 post OP

Die starke Resorption der Kortizes, die in der Mutante am Tag 21 zu finden war, zeigte sich nun auch im WT. Eine vollständige knöcherne Überbrückung war jedoch nicht zu erkennen. Am Kallusrand und am Geflechtknochen befanden sich viele Osteoblasten. Knorpelrückstände waren nicht mehr vorhanden und das Kallusvolumen hatte weiterhin abgenommen.

Die Tiere des RAG1^{-/-} Stammes hatten dagegen eine knöcherne Überbrückung des Spaltes erreicht. Der Geflechtknochen war fast vollständig ossifiziert und die Osteoblasten waren im Gegensatz zum WT nicht über den gesamten Kallus verteilt, sondern befanden sich fast ausschließlich an der Kallusaussenseite.

Eine Übersicht über den Kallus im gesamten Heilungsverlauf ist in Abbildung 24 dargestellt.

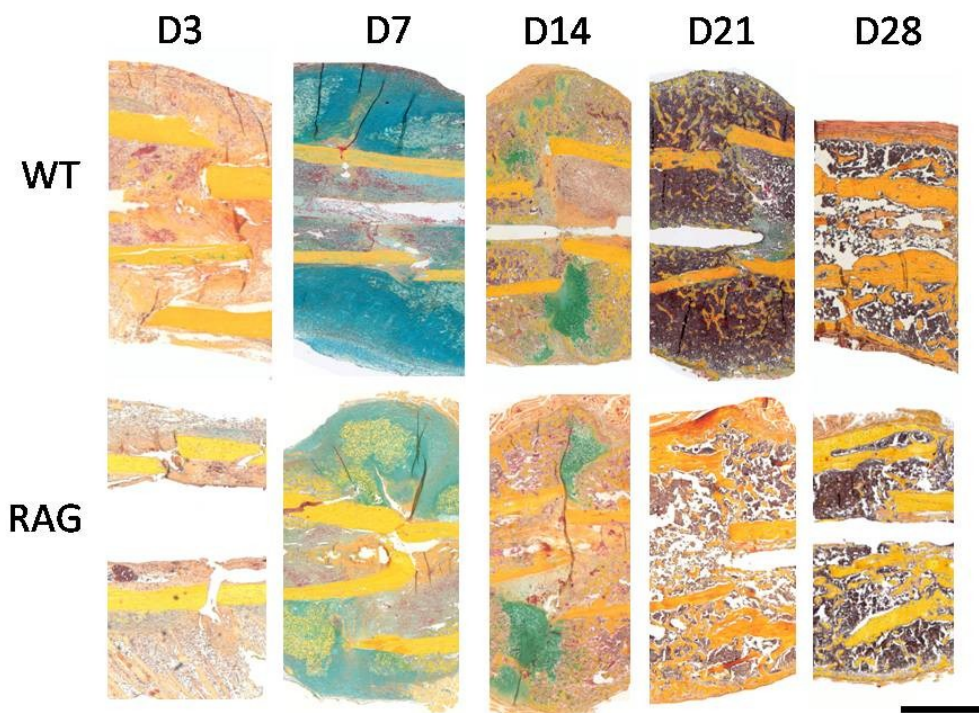


Abb. 24: Übersicht über den Heilungsverlauf: Die Unterschiede zwischen beiden Versuchsgruppen ab Tag 7 sind zu erkennen. Während im WT die Chondrozyten langsam hypertroph werden, hat in den RAG1^{-/-} Tieren bereits die Ossifikation der Matrix eingesetzt. Die 4 Verknöcherungszonen an den Kortizes treten klar hervor. Die Resorption der Kortizes ist im Verlauf erkennbar. Maßstab = 2mm

3.2.2 Die histomorphometrischen Untersuchungen zeigten zu jedem Zeitpunkt der Frakturheilung mehr Knorpel in den WT Tieren

Die histomorphometrische Analyse wurde mit einem eigens für die Messung der Gewebeteile geschriebenen Programm an den Movat Pentachrom gefärbten Schnitten durchgeführt. Zu jedem Untersuchungszeitpunkt gingen 8 Schnitte pro Versuchsgruppe in die Auswertung ein. Dabei wurden knöcherne Gewebe, Knorpelfläche, Knochenmarksfläche und Bindegewebsfläche bezogen auf die Gesamtkallusfläche analysiert. Bei der Betrachtung des knöchernen Gewebes wurden die Kortizes nicht einbezogen, sondern lediglich das neu entstandene knöcherne Gewebe.

Wie in Abbildung 25 zu erkennen, zeigten beide Versuchsgruppen einen zeitlich sehr ähnlichen Ablauf der Verknöcherung während der Frakturheilung. In beiden Gruppen stieg der prozentuale Anteil des verknöcherten Gewebes am Gesamtkallus bis zum Tag 21 nach Fraktur an, mit einem Median von 24,7% (Maximum 50,9%) im WT und im RAG1^{-/-} von 29,4% (Maximum 40,5%). Zum Tag 28 nahm die Menge des verknöcherten Gewebes etwas ab (WT: Median 23,1%; RAG1^{-/-}: Median 17,4). Deutliche Unterschiede waren zwischen WT und RAG1^{-/-} Tieren nur an Tag 3 und Tag 7 aufgetreten. An Tag 3 nach der Fraktur zeigte sich im Kallus der WT Tiere eine größere Menge verknöcherten Gewebes als in den RAG1^{-/-} Tieren. Ein deutlicherer Unterschied im TOT-Anteil (total osseous tissue) zeigte sich an Tag 7. Hier befand sich deutlich mehr verknöchertes Gewebe in den Kallus der Mutanten (WT: Median 4,5%; RAG1^{-/-}: Median 9,4%; p= 0,021). Eine Zusammenfassung der Werte im Heilungsverlauf ist in Tabelle 8 ersichtlich.

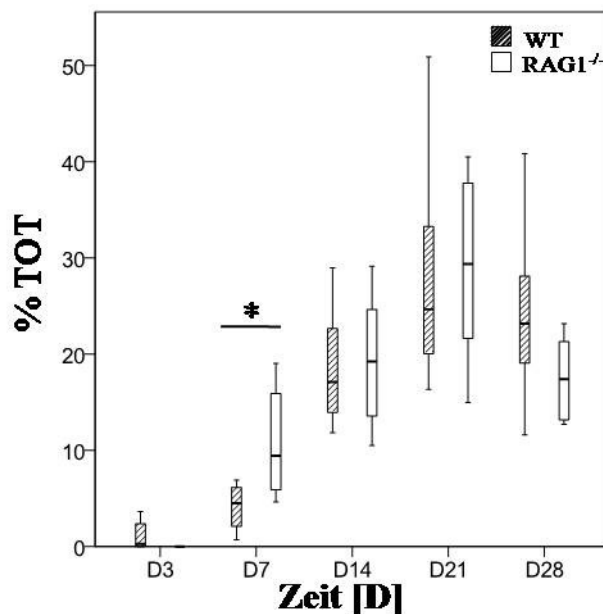


Abb. 25: Anteil des verknöcherten Gewebes am Gesamtkallus in Prozent über den Heilungsverlauf in beiden Versuchsgruppen. p* < 0,05, TOT= verknöchertes Gewebe in Prozent zum Gesamtkallus

Tab. 8: Anteil des verknöcherten Gewebes am Gesamtkallus in Prozent mit Angabe des Median, Min- und Max-Werten und des p- Wertes

Zeitpunkt post OP	Versuchsgruppe	verknöchertes Gewebe TOT [%]		
		Median	Min-Max	p-Wert
3 Tage	WT	0,3	0-3,6	0,128
	RAG	0	0-0,6	
7 Tage	WT	4,5	0,7-6,9	0,021
	RAG	9,4	4,6-19	
14 Tage	WT	17,1	11,8-29	0,878
	RAG	19,2	10,5-29,1	
21 Tage	WT	24,7	16,3-50,9	0,645
	RAG	29,4	15-40,5	
28 Tage	WT	23,1	11,6-40,8	0,181
	RAG	17,4	12,7-23,1	

Bei der Betrachtung der Knorpelfläche im Frakturkallus beider Versuchsgruppen zeigte sich ein sehr ähnlicher zeitlicher Verlauf (Abb. 26). An Tag 3 wurde in beiden Gruppen kein Knorpelgewebe gefunden. Eine massive Bildung von Chondrozyten stellte sich aber zum Tag 7 ein, wobei der Anstieg im WT stärker ausfiel. Am Ende des Untersuchungszeitraumes waren beide Versuchsgruppen jedoch bei einer Knorpelfläche von 0% angelangt. An den Tagen 7, 14 und 21 war der Knorpelanteil im WT immer deutlich höher als im RAG1^{-/-} (Tag 7: p= 0,021; Tag 14: p= 0,007; Tag 21: p= 0,044). Mit einem Median von 47,7% lagen die Knorpelflächen im WT an Tag 7 deutlich über dem der Mutanten mit 36% (Tab. 9).

Tab. 9: Zusammenfassung des Knorpelanteils in Prozent des Gesamtkallus; mit Angabe des Median, Min- und Max-Werten und des p- Wertes.

Zeitpunkt post OP	Versuchsgruppe	Knorpelfläche [%]		
		Median	Min-Max	p-Wert
3 Tage	WT	0	0	
	RAG	0	0	
7 Tage	WT	47,7	38,2-61,6	0,021
	RAG	36	12,1-46,7	
14 Tage	WT	13,1	9,1-28,3	0,007
	RAG	4,7	0,4-13,3	
21 Tage	WT	1,7	0,1-4,8	0,044
	RAG	0,1	0-6,5	
28 Tage	WT	0	0	
	RAG	0	0	

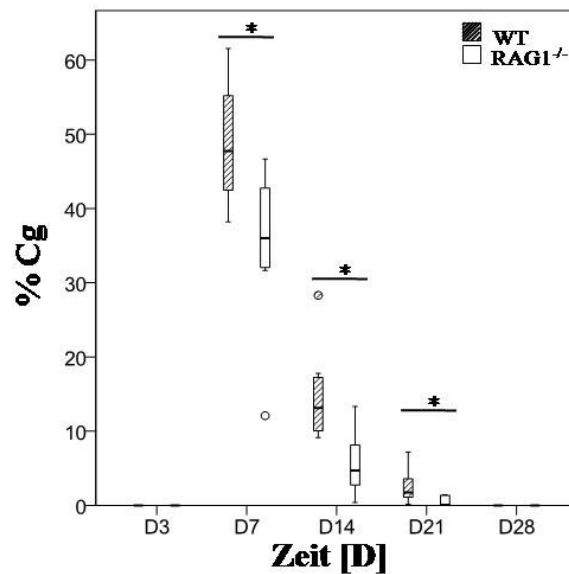


Abb. 26: Übersicht des Knorpelanteils am Gesamtkallus; Cg (Cartilage; Knorpel) über den Heilungsverlauf in beiden Versuchsgruppen, $p^* < 0.05$

3.2.3 Der Frakturkallus der WT Tiere wies weniger Osteoklasten auf

Um die Resorption durch Osteoklasten in den Versuchsgruppen zu untersuchen, wurde eine TRAP Färbung durchgeführt. Hierbei färbten sich Osteoklasten aufgrund einer enzymatischen Reaktion rosa an. In der Auswertung wurden Zellen als Osteoklasten gezählt, wenn sie eine rosa Färbung aufwiesen, mehr als zwei Zellkerne besaßen und im Kontakt zum Knochen standen. Für die statistische Auswertung wurden diese Osteoklasten im Kallus gezählt und auf die Gesamtkallusfläche bezogen (Abb. 27).

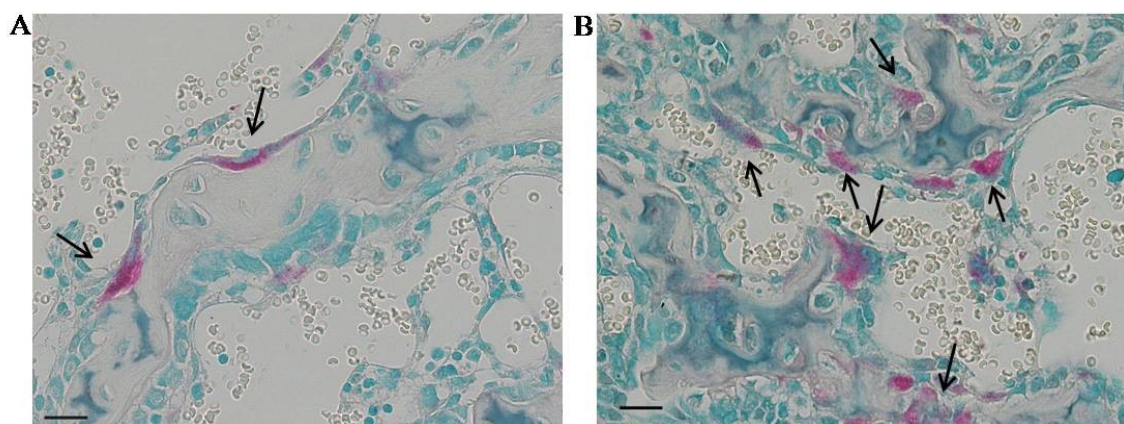


Abb. 27: Repräsentative Darstellung der Osteoklasten im Kallus in WT (A) und RAG1^{-/-} Tieren (B) an Tag 14 nach Setzen der Fraktur. Die Osteoklasten erscheinen in der Abbildung rosa. Eine Gegenfärbung der Zellkerne erfolgte mit Methylgrün. Maßstab = 20µm.

In der Osteoklastenzahl bezogen auf die Gesamtkallusfläche unterschieden sich die beiden Versuchsgruppen deutlich. Nach dem Setzen der Fraktur kam es in beiden Versuchsgruppen zu einer Erhöhung der Osteoklastenzahlen, die sich an Tag 7 und Tag 14 am deutlichsten

unterschieden. So hatte zu beiden Zeitpunkten der RAG1^{-/-} Stamm deutlich mehr Osteoklasten ($p=0,02$; $p=0,05$). Die maximale Osteoklastenzahl im Kallus konnte an Tag 21 detektiert werden. Die WT Tiere erreichten einen Median von 10 Osteoklasten (OC) pro mm² Gesamtkallusfläche, während die Mutante einen Median von 19,1 OC pro mm² aufwies. Anschließend gingen die Osteoklastenzahlen in beiden Tiergruppen zurück. Dieser Rückgang war in der Mutante stärker ausgeprägt (Abb. 28). Eine Zusammenfassung der Osteoklastenzahlen über die Zeit stellt Tab. 10 dar.

Tab. 10: Zusammenfassung der absoluten Osteoklastenzahlen des Gesamtkallus über den gesamten Frakturheilungszeitraum mit Angabe des Medians, Min- und Max-Werten und des p-Wertes.

Zeitpunkt post OP	Versuchsgruppe	Osteoklasten/Gesamtfläche [mm ⁻²]		
		Median	Min-Max	p-Wert
3 Tage	WT	0	0	
	RAG	0	0	
7 Tage	WT	0,2	0-3	0,02
	RAG	4,9	1-13	
14 Tage	WT	5,3	0-48	0,05
	RAG	27	4-63	
21 Tage	WT	10,0	0-25	0,195
	RAG	19,1	0-51	
28 Tage	WT	8,6	0-29	0,234
	RAG	2,3	0-25	

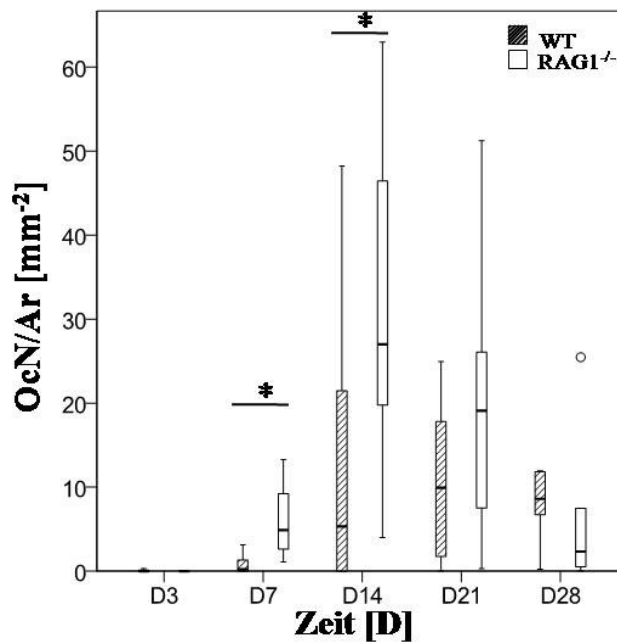


Abb. 28: Graphische Darstellung der Osteoklastenzahlen pro mm² Gesamtkallus über den Heilungszeitraum. $p<0,05$; OcN = Osteoklastenzahl; Ar = Gesamtkallus

3.2.4 Die Osteoidquantifikation zeigte keine Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen

Beim Osteoid handelt es sich um die noch nicht mineralisierte von Osteoblasten sekretierte Matrix. Um eine eventuelle Störung der Matrixmineralisation zu untersuchen, wurde eine Van Gieson/ Von Kossa Färbung durchgeführt. Hierbei erschien die mineralisierte Matrix schwarz und das Osteoid pink. Für die Auswertung wurden pro Schnitt 3 Gesichtsfelder analysiert. Dabei wurde zunächst die Knochenoberfläche auf der sich Osteoid befand, vermessen (siehe Abb. 29A) und anschließend die Osteoidfläche quantifiziert (Abb. 29B). Eine statistische Auswertung der Daten erfolgte nicht, da nur je ein Schnitt dreier Versuchstiere in die Analyse einging.

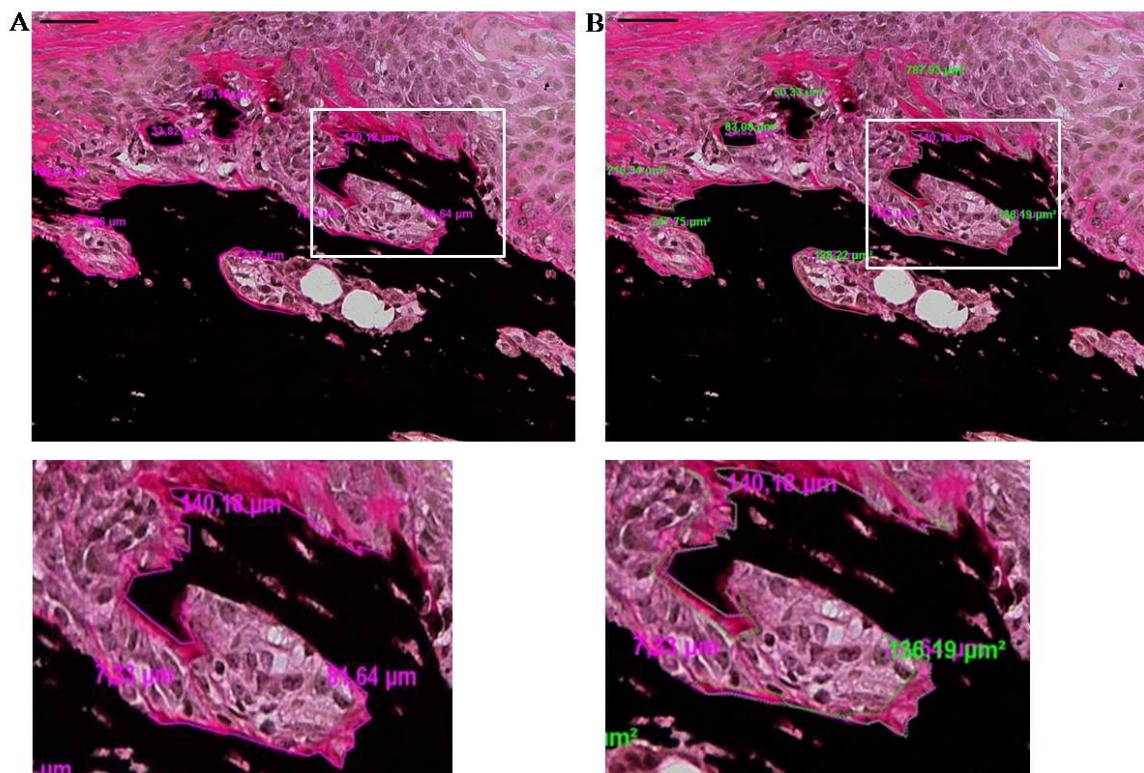


Abb. 29: Darstellung der Auswertung der Osteoidfärbung. Ausmessen der Knochenoberfläche mit Osteoid (A) und Bestimmung der Osteoidfläche (B). Maßstab = 100 μ m. In schwarz ist deutlich die mineralisierte Matrix erkennbar, auf ihr befindet sich eine dünne Osteoidschicht (pink). In rosa sieht man die Zellen des Knochenmarks.

Die Auswertung der Osteoidfärbung zeigte keine deutlichen Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen (Abb. 30). Zwischen Tag 7 und Tag 14 nach der Operation stieg die Osteoidmenge pro μ m an, dieser Anstieg war in beiden Gruppen in etwa gleich stark. In den WT Tieren lagen rund 2 μ m² Osteoid pro μ m Knochenoberfläche vor, während es in den RAG1^{-/-} Tieren 1,8 μ m² pro μ m Knochenoberfläche waren. Anschließend kam es zu einem

minimalen Abfall der Osteoidfläche zum drei Wochenzeitpunkt (WT: 4,3 μm^2 pro μm Knochenoberfläche; RAG1^{-/-}: 4,5 μm^2 pro μm Knochenoberfläche). Die einzelnen Werte der Osteoidauswertung finden sich in Tabelle 11.

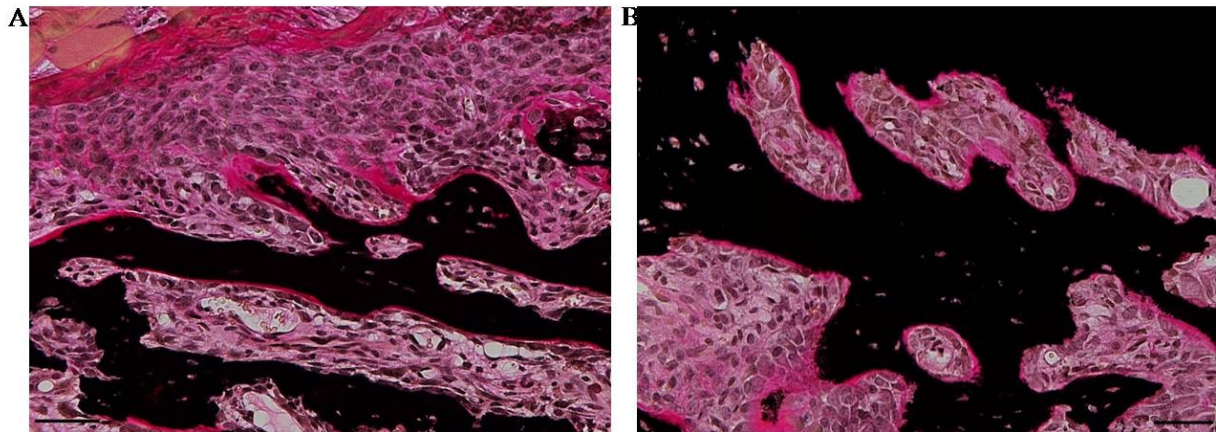


Abb. 30: Unterschiede in der Osteoidmenge zwischen dem WT (A) und der Mutante (B) zum Zeitpunkt D7 sind nicht erkennbar. In beiden Tierstämmen ist die mineralisierte Matrix von Osteoid bedeckt. Maßstab = 100 μm

Tab. 11: Mittelwerte der Vermessung des Osteoids pro μm Knochenoberfläche. MW = Mittelwert

Zeitpunkt post OP	Versuchsgruppe	MW Osteoidfläche pro μm Knochen
7 Tage	WT	1,96
	RAG	1,78
14 Tage	WT	4,55
	RAG	4,77
21 Tage	WT	4,32
	RAG	4,46

3.3 Immunhistologische Untersuchungen

Bei den immunhistologischen Färbungen handelt es sich um spezifisch mit einem Antikörper detektierte Antigene, die mittels einer Farbreaktion sichtbar gemacht werden. Diese Form der Färbung ist spezifischer als die histologischen Färbungen und es können einzelne Antigene und nicht nur ganze Gewebe gefärbt werden.

3.3.1 Veränderte Kollagenlokalisationen in beiden Versuchstiergruppen

Bei den Kollagenen handelt es sich um Strukturproteine des Bindegewebes, wozu Knochen, Knorpel, Sehnen und Bänder gehören. Mithilfe von Antikörpern sollte die mengenmäßige Verteilung der verschiedenen Kollagene im Kallus beider Versuchstiergruppen untersucht

werden. Der immunhistologische Nachweis der Kollagene wurde nur an Tag 7 durchgeführt, da hier in der Movat Pentachrom Färbung und der histomorphometrischen Auswertung die deutlichsten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen zu finden waren. Kontrollen wurden zu jeder Färbung mitgeführt, um die Spezifität der jeweiligen Antikörper sicher zu stellen. Eine quantitative Bestimmung erfolgte in diesen Untersuchungen nicht, da nur 3 Tiere pro Versuchsgruppe gefärbt wurden.

Die Kollagen I Synthese war im WT vermehrt

Kollagen I ist ein im Knochengewebe vorkommendes strukturiert angeordnetes Protein.

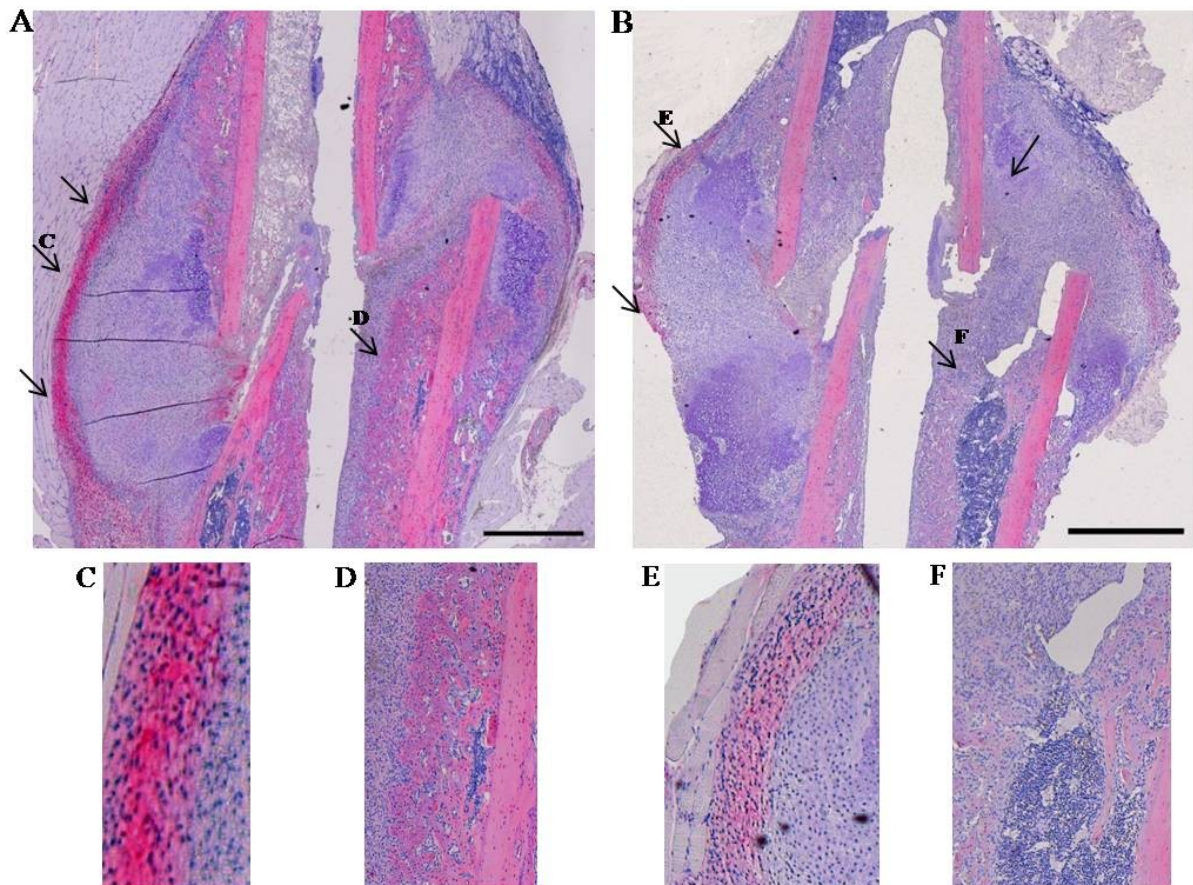


Abb. 31: Kollagen I Färbung des WT (A) und im RAG1^{-/-} (B) am Tag 7 post OP. Kollagen I positive Bereiche sind rosa angefärbt. Die Gegenfärbung erfolgte mit Hämatoxylin nach Meyers. Die Pfeile zeigen Kollagen I Überbrückung im WT, in den RAG1^{-/-} Tieren ist diese nicht vollständig. Die Bildung von endostalem Geflechtknochen ist in den Mutanten nicht so deutlich sichtbar. Die Buchstaben an einigen Pfeilen zeigen die vergrößerten Kallusbereiche C-F.

In beiden Versuchsgruppen färbten sich die Kortizes und neu gebildeter Knochen rosa (Abb. 31). Man sah in beiden Tieren eine beginnende Knochenbildung vom Rand des Kallus aus in Richtung Kallusmitte. Auch endostal kam es bereits zu einer geringen Knochenbildung. Im Gegensatz zu den RAG1^{-/-} Tieren zeigte sich in den WT schon ein Außenkallus in den

Kollagen I eingelagert war. Generell war die Verteilung von Kollagen I großflächiger und gleichmäßiger. Im Kallus der RAG1^{-/-} Tiere war weniger Kollagen I nachweisbar.

Kollagen II im WT verstärkt

Kollagen II ist charakteristisch für hyalinen Knorpel. Mithilfe dieses Nachweises sollten mögliche Unterschiede in der Knorpelmenge und des Reifegrads des Knorpels untersucht werden.

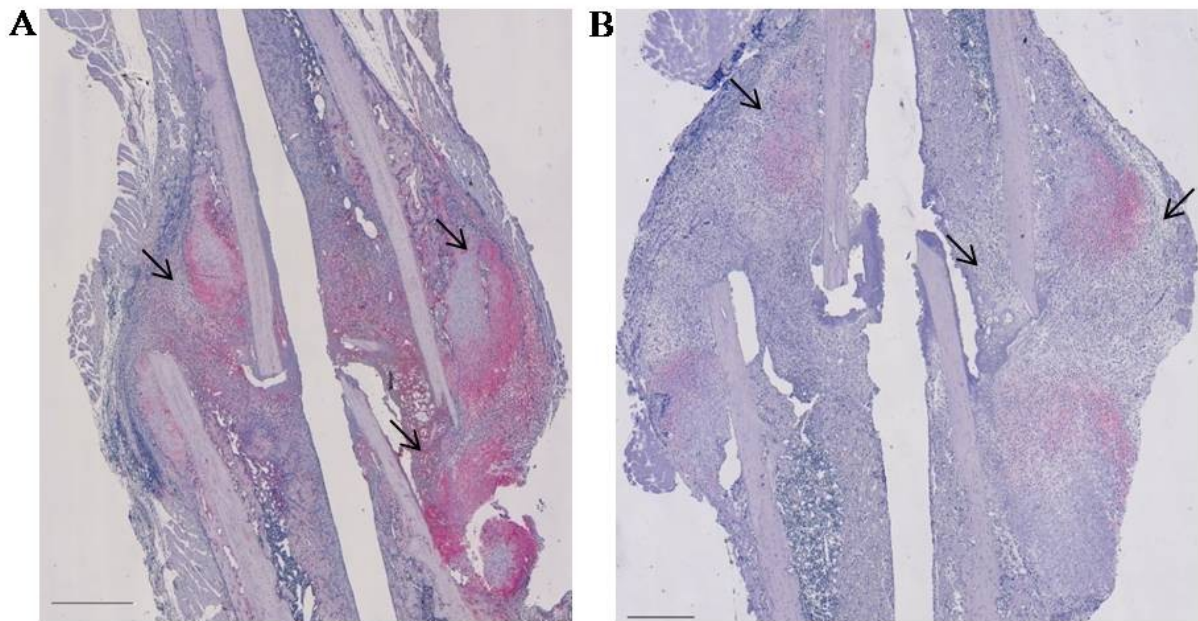


Abb. 32: Darstellung der Kollagen II Färbung im WT (A) und RAG1^{-/-} (B) an Tag 7 post OP. Maßstab = 2mm; rosa = Kollagen II; Lila = Zellkerne gefärbt mit Eisenhämatoxylin nach Meyer

Die Kollagen II Färbung zeigte Unterschiede zwischen den beiden Versuchsgruppen. Wie in Abb. 32 zu erkennen, waren im WT größere Bereiche des Kallus positiv für Kollagen II und folglich mit hyalinem Knorpel gefüllt. In den RAG1^{-/-} Tieren waren nur 4 distinkte Bereiche zu erkennen, in denen dieser Knorpeltyp auftrat.

Kollagen X wurde in den Mutanten nur spaltfern gefunden

Kollagen X kann in hypertrophen und damit reiferen Knorpel nachgewiesen werden. Mit dieser immunhistologischen Färbung sollten Unterschiede zwischen den Tierstämmen untersucht werden, die beim Übergang der knorpeligen in die knöcherne Phase entstehen.

Bei der Kollagen X Färbung zeigten sich im WT nur wenige Bereiche schwach positiv, die direkt an den Fraktarenden gefunden wurden. In der RAG1^{-/-} Versuchsgruppe wurde hingegen ein stärkeres Signal gefunden, welches sich über einen größeren Bereich ausdehnte. Sie befanden sich jedoch weit entfernt vom Frakturspalt (Abb. 33).

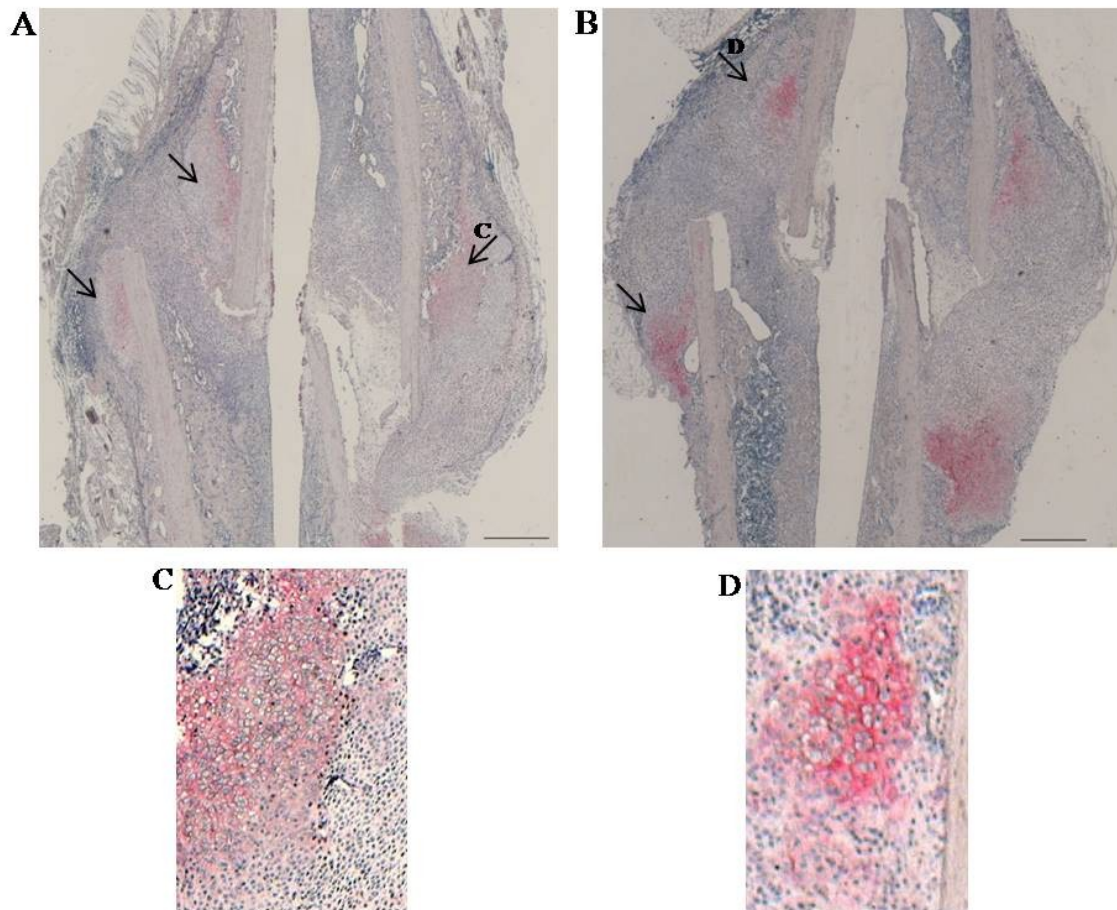


Abb. 33: Kollagen X Färbung des Kallus im WT (A) und in der Mutante (B) an Tag 7 post OP. Die Buchstaben an den Pfeilen zeigen aus welcher Region des Kallus die gezoomten Bilder C und D stammen. Maßstab = 2mm; rosa = Kollagen X; lila = Zellkerne

3.3.2 Kaum veränderte Osteoblastenzahlen im WT

Osteokalzin wird spezifisch von Osteoblasten gebildet und ist folglich ein Indikator für Knochenaufbau. Daher wurde dieser Marker genutzt, um möglicherweise auftretende Unterschiede in der Osteoblastenzahl zu analysieren.

In jedem histologischen Schnitt wurden 3 Gesichtsfelder ausgewertet. Dabei wurden zunächst die Osteokalzin-positiven Zellen gezählt und anschließend die Länge der Knochenoberfläche ausgemessen, auf der sie sich befanden (Abb. 34).

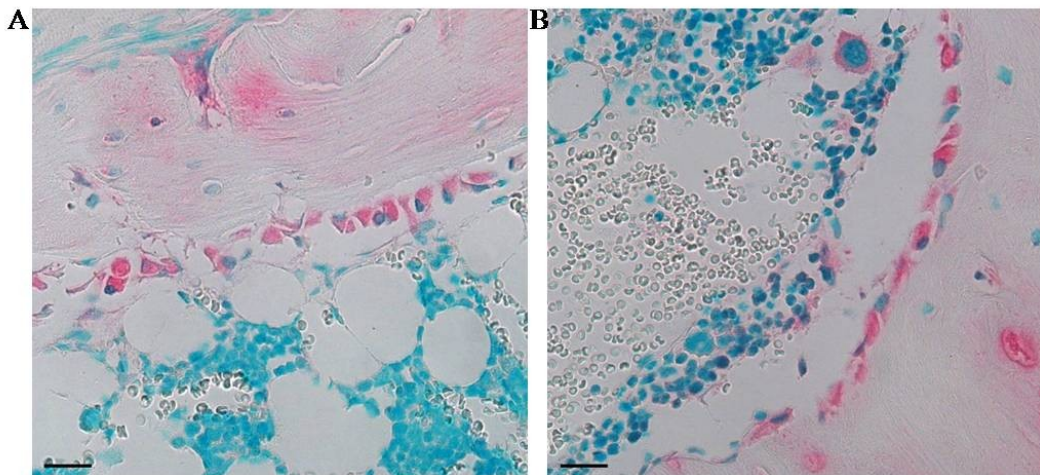


Abb. 34: Osteokalzin-Färbung im WT (A) und $RAG1^{-/-}$ (B) an Tag 28. Osteokalzin positive Zellen sind rosa angefärbt, die Gegenfärbung der Zellkerne erfolgte mit Methylgrün. Maßstab = 20μm

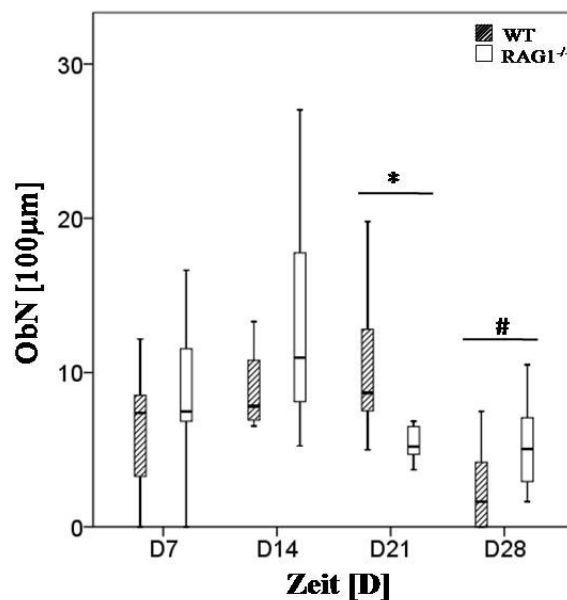


Abb. 35: Darstellung der Ergebnisse der Osteoblastenanalyse. Dabei wurden alle Zellen gezählt, die positiv für Osteokalzin waren. Angegeben sind die Osteoblastenzahlen pro 100μm Knochenlänge. ObN = Osteoblastenzahl, $p < 0,05$; $p \# < 0,1$

Am Anfang der Frakturheilung (Tag 7) unterschieden sich WT (Median 7,4 ObN/100μm) und $RAG1^{-/-}$ (Median 7,5 ObN/100μm) Tiere kaum hinsichtlich ihrer Osteoblastenzahlen. Dieser Unterschied nahm mit Voranschreiten des Heilungsverlaufs zu. Während in den knock out Tieren (KO) die maximale Osteoblastenzahl (Median 11 ObN/100μm) am Tag 14 erreicht wurde, dauerte es in den WT Tieren (Median 8,7 ObN/100μm) bis zum Tag 21. In beiden Gruppen kam es nach dem Erreichen des Maximums zu einem Abfall der Osteoblastenzahlen. Einen deutlichen Unterschied zwischen beiden Versuchsgruppen gab es am Tag 21 ($p = 0,006$). Dieser Unterschied schwächte sich zum Tag 28 ab und war nur noch als Trend erkennbar ($p = 0,057$). Die Osteoblastenzahlen blieben in den KO Tieren zwischen Tag 21 und 28 fast

identisch, während es im WT zu einer Abnahme kam. Die statistische Auswertung ist in Abb. 35 ersichtlich und die einzelnen Werte in der Tabelle 12 aufgelistet.

Tab. 12: Zusammenfassung der relativen Zahlen aus der Analyse der Osteoklazin- Färbung. Mit Angabe des Medians, der mini- und maximalen Osteoblastenzahlen pro 100µm Knochen und den p- Werten.

Zeitpunkt post OP	Versuchsgruppe	Osteoblasten pro 100µm Knochen		
		Median	Min-Max	p-Wert
7 Tage	WT	7,4	0-52,3	0,73
	RAG	7,5	0-16,6	
14 Tage	WT	7,8	6,5-13,3	0,258
	RAG	11	5,3-27	
21 Tage	WT	8,7	4,2-19,8	0,006
	RAG	5,2	3,7-6,6	
28 Tage	WT	1,6	0-5	0,057
	RAG	5	1,6-10,5	

3.3.3 Faktor VIII Färbung

Faktor VIII ist ein Glykoprotein, das von Endothelzellen gebildet wird. Im Versuch wurde dieser Faktor genutzt um die Gefäßneubildung in den Versuchstieren zu beurteilen.

Tab. 13: Zusammenfassung der Ergebnisse der Faktor VIII Färbung

Zeitpunkt post OP	Versuchsgruppe	Gefäße (MW)			
		Femurkopf	spaltnah	knienah	im Muskel
3 Tage	WT	0	0	0	1
	RAG	16	3	5	12
7 Tage	WT	1	7	1	28
	RAG	5	3	7	9
14 Tage	WT	2	0	4	9
	RAG	8	3	6	12
21 Tage	WT	2	0	0	19
	RAG	7	2	3	3
28 Tage	WT	0	1	0	4
	RAG	5	4	8	13

Die Auszählung der Gefäße zeigte keine auffälligen Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen (Tab. 13). Im Knochen, Knochenmark bzw. dem neu gebildeten Kallus konnten kaum Gefäße nachgewiesen werden. Tendenziell war die Gefäßanzahl in den RAG1^{-/-} Tieren im Vergleich zum WT leicht erhöht. Die meisten Gefäße konnten im Knochen umgebenden Muskelgewebe gefunden werden. Wobei auch hier kein eindeutiges Muster zu finden war. An

den Tagen 3, 14 und 28 waren die Gefäße in den RAG1^{-/-} Tieren zahlenmäßig stärker vertreten, an den Tagen 7 und 21 im WT.

3.4 Immunofluoreszenz

3.4.1 In den RAG1^{-/-} Tieren wurde früher im Heilungsprozess Knochen gebildet

Mit Hilfe dieser Methode war es möglich dynamische Umbauprozesse im Knochen während der Frakturheilung darzustellen. Dafür wurden den Tieren Fluoreszenzfarbstoffe injiziert. Durch die unterschiedlich gefärbten Bereiche war die Differenzierung neugebildeten Knochens in unterschiedlichen Heilungsphasen möglich und ließ Rückschlüsse auf die Dynamik der Neubildung zu. Eine statistische Auswertung erfolgte aufgrund der wenigen untersuchten Proben (3 Tier pro Versuchsgruppe/Zeitpunkt) nicht.

7 Tage post OP

Den Tieren wurde 48 Stunden vor der Tötung das Fluorochrom Alizarinkomplexon injiziert, welches sich fluoreszenz mikroskopisch rot darstellen lässt (Abb. 36). Es zeigte sich in beiden Tieren bereits am siebenten Tag nach dem Setzen der Fraktur eine deutliche Knochenneubildung, die jedoch in den RAG1^{-/-} Tieren mit der fünffachen Fläche im Spaltbereich ausgeprägter war.

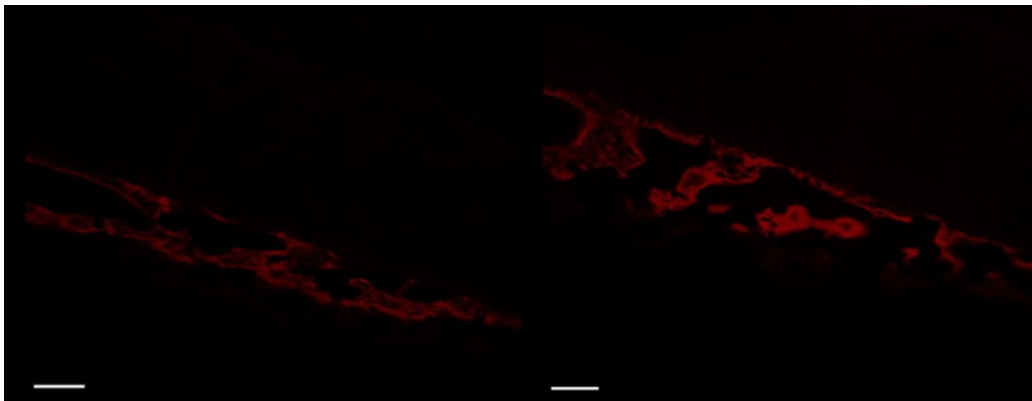


Abb. 36: Vergleich des neugebildeten Knochens zwischen Tag 5 und 7 nach dem Setzen der Fraktur in WT (A) und RAG1^{-/-} Tieren (B) am Rand des Kallus; rot = eingelagertes Alizarinkomplexon; Maßstab = 100µm

Der WT selbst zeigte keinen deutlichen Unterschied zwischen dem Spaltbereich und dem Rand des Kallus. Die genauen Alizarinkomplexon-positiven Flächen sind in Tabelle 14 zusammengefasst.

Tab. 14: Zusammenfassung der neugebildeten Knochens in einem Sichtfenster im Kallus und einem genau am Frakturspalt.

Zeitpunkt post OP	Versuchsgruppe	MW Knochenfläche Spalt	MW Knochenfläche Kallus
		μm^2	μm^2
7 Tage	WT	10.714	11.253
	RAG	50.722	17.241

14 Tage post OP

Um die dynamischen Veränderung darzustellen, haben die an Tag 14 getöteten Tiere an Tag 5 eine Injektion mit Alizarinkomplexon und zusätzlich 48 Stunden vor ihrer Tötung eine Calcein grün Injektion erhalten.

Sowohl im Kallus als auch fraktur nah kam es zu einer weiteren Einlagerung von Alizarinkomplexon. Die Flächen stiegen in den WT Tieren im Spalt auf das 10- fache an, in den KO-Tieren kam es zu einer Verdoppelung der Knochenfläche. Im Spaltbereich wiesen an diesem Punkt im Heilungsverlauf beide Versuchsgruppen ähnliche Mengen neuen Knochens auf (Abb. 37 und 38). Am Kallusrand zeigten sich jedoch Unterschiede. Hier hatten die WT Tiere etwa dreimal soviel neuen Knochen gebildet wie die RAG1^{-/-} Tiere. Ein weiterer Unterschied ließ sich in den mikroskopischen Bildern erkennen, in den Wildtypen wirkte das eingelagerte Fluorochrom diffuser verteilt, während in den RAG1^{-/-} Tieren teilweise distinkte Bandenmuster zu erkennen waren.

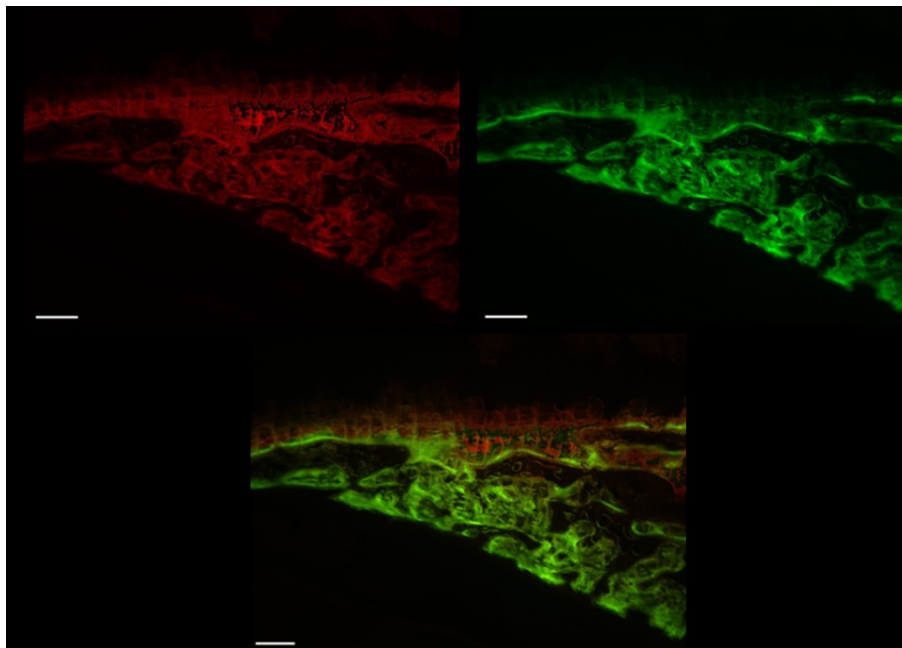


Abb. 37: Einlagerung der Fluorochrome nach 14 Tagen im WT. Dargestellt sind die Einlagerung von Alizarinkomplexon (A), sowie Calcein grün (B). Eine Überlagerung beider Farben ist im Bild C dargestellt. Maßstab = 100 μm

Ebenso hatte zwischen Tag 12 und 14 eine Einlagerung von Calcein grün stattgefunden. Diese war nicht so stark, wie die Einlagerung des Alizarinkomplexons. Im Spaltbereich hatten beide Versuchsgruppen in etwa gleich viel Fluorochrom eingelagert, wohingegen am Kallusrand ein Unterschied zu erkennen war. Hier kam es zu einer Knochenneubildung die im WT um den Faktor 3 erhöht war. Generell hatte jedoch zwischen Tag 12 und 14 eine stärkere Einlagerung stattgefunden, als zwischen Tag 5 und 7 nach der OP (siehe Tab. 15).

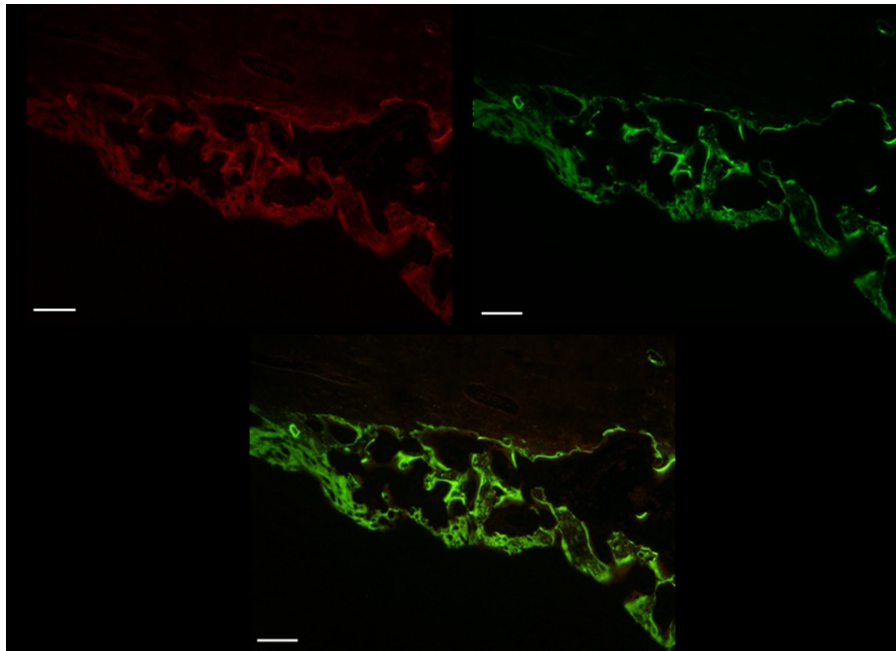


Abb. 38: Fluorochromeinlagerung in den $RAG1^{-/-}$ Tieren. Dargestellt sind Alizarinkomplexon (A), Calcein grün (B) und eine Überlagerung beider Farben (C). Maßstab = 100 μ m

Tab. 15: Zusammenfassung der absoluten Werte der Knochenneubildung an Tag 14 post Fraktur.

Zeitpunkt post OP	Versuchsgruppe	MW Knochenfläche Spalt	MW Knochenfläche Kallus
		μm^2	μm^2
14 Tage	WT rot	95.538	182.494
	RAG rot	107.950	62.659
	WT grün	40.052	91.703
	RAG grün	31.439	33.636

21 Tage post OP

Das dritte Fluorochrom, welches den Tieren an Tag 19 injiziert wurde, war Calcein blau. Auch hier wurden die Tiere 48 Stunden später getötet.

In beiden Versuchsgruppen trat ein deutlicher Abbau des in der frühen Phase der Frakturheilung neugebildeten Knochens auf. Es war nur noch wenig rot fluoreszierendes Gewebe

erkennbar. Die Fläche des am Anfang gebildeten Knochens im Kallus ging in den $RAG1^{-/-}$ Tieren auf etwa ein Fünftel zurück, ähnlich verhielt es sich in den Wildtypen (Abb. 39 und 40).

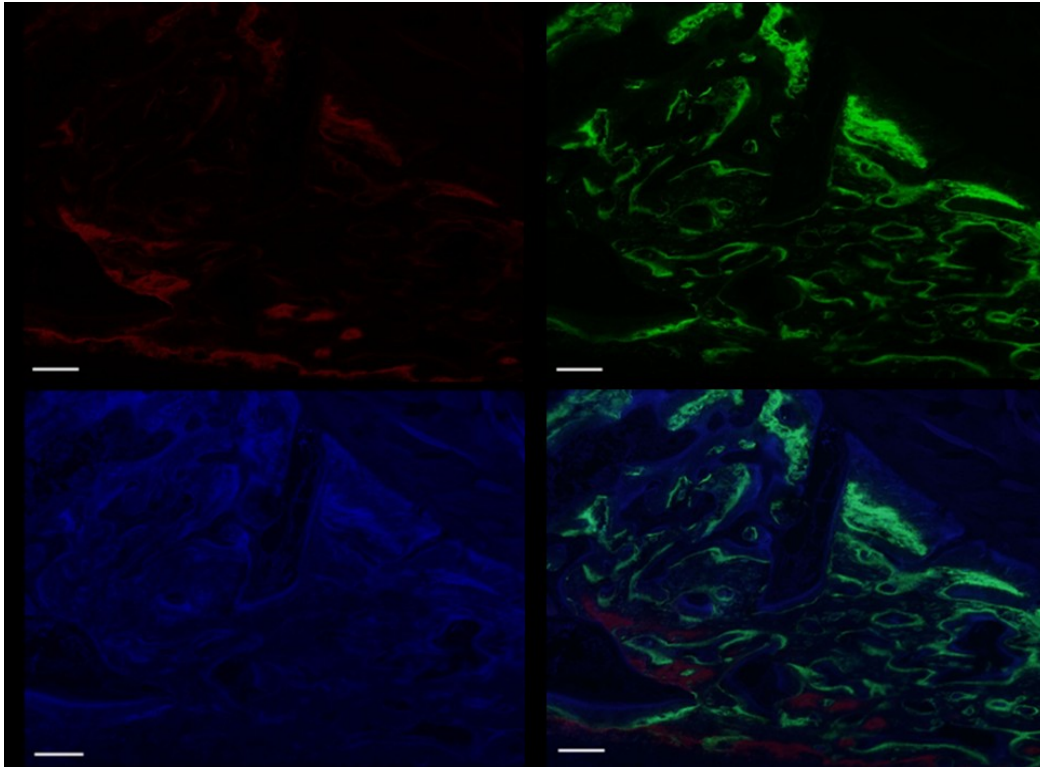


Abb. 39: *In vivo* Fluoreszenzmarkierung 21 Tage nach der Fraktur. Die Einlagerung von Alizarinkomplexon (A), Calcein grün (B), Calcein blau (C) und den übereinander gelegten Fluoreszenzen im Kallus des WT sind hier ersichtlich. Maßstab = 100µm

Im Frakturspalt der $RAG1^{-/-}$ Tiere war dieser Abbau noch deutlicher. Hier konnten kaum noch rot fluoreszierende Bereiche detektiert werden. In den Wildtypen nahm die Knochenmasse mit eingelagertem Alizarinkomplexon um drei Viertel ab.

Das zum Tag 14 neugebildete knöcherne Gewebe im Kallus der $RAG1^{-/-}$ Tiere zeigte keine Veränderung, während es in den Wildtypen zu einer Abnahme auf ein Drittel der Knochenfläche kam. Es konnte kein deutlicher Unterschied in der verknöcherten Fläche beobachtet werden, da am Tag 14 im WT etwa die dreifache Menge an knöchernem Gewebe auftrat. Somit kam es zum Tag 21 nur zu einer Angleichung der KO- an die WT-Tiere. Der Knochenumbau war im Frakturspalt deutlicher zu beobachten. Hier wurde der zum Tag 14 gebildete Knochen schon stark resorbiert. In den $RAG1^{-/-}$ Tieren schrumpfte die Knochenfläche mit grüner Fluoreszenz auf ein Dreißigstel, im WT immerhin auf ein Drittel (siehe Tab. 16).

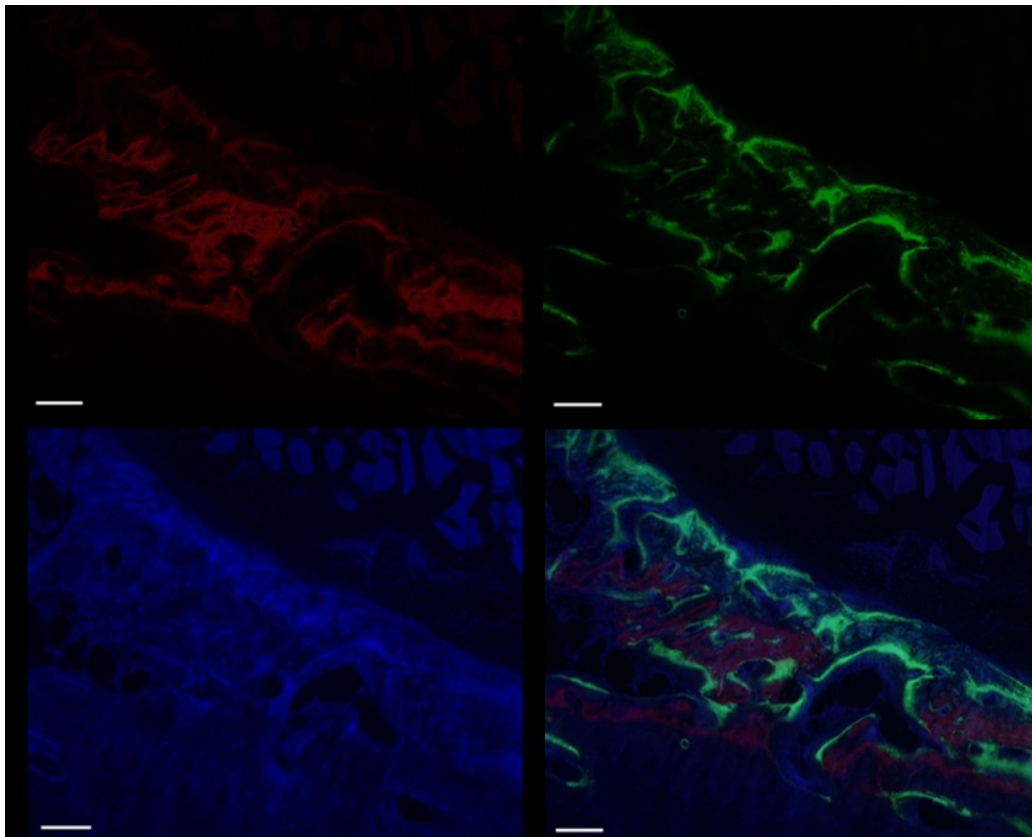


Abb. 40: Dynamik von Knochenneubildung und –Resorption in den $RAG1^{-/-}$ Tieren. Dargestellt sind Alizarinkomplexon (A), Calcein grün (B), Calcein blau (C) und eine Überlappung der drei Fluorochrome. Maßstab = 100 μ m

Tab. 16: Zusammenfassung der Auswertung der *in vivo* Fluorochrommarkierung am Tag 21 post OP

Zeitpunkt post OP	Versuchsgruppe	MW Knochenfläche Spalt	MW Knochenfläche Kallus
		μm^2	μm^2
21 Tage	WT rot	3.945	15.624
	RAG rot	37	19.590
	WT grün	12.992	35.770
	RAG grün	1.184	30.077
	WT blau	40.625	38.811
	RAG blau	5.501	6.113

Die Einlagerung von Calcein blau und somit die Knochenneubildung zwischen Tag 19 und 21 nach dem Setzen der Fraktur war in den WT Tieren stärker ausgeprägt. Am Kallusrand sowie spalt nah zeigte sich jedoch in etwa die gleiche neue Knochenfläche, wobei im WT die vier- bis fünffache Menge Knochen gebildet wurde.

3.4.2 Nachweis spezifischer Immun- und Knochenzellen

B- Lymphozyten verschiedener Reifephasen waren im Knochenmark nachweisbar

Wie schon im nativen Knochen wurden die B-Lymphozyten Subpopulationen nur im WT untersucht. In Abbildung 41 ist der Frakturkallus an Tag 7 gezeigt. Zu diesem Zeitpunkt hatte sich bereits ein Kallus gebildet. Dieser war am Rand von B-Lymphozyten infiltriert. Dabei handelte es sich in der Mehrzahl um $B220^+ IgD^+$ Zellen. Vereinzelt konnten auch $B200^+ IgM^+$ und $B220^+ IgD^+ IgM^+$ Zellen gefunden werden. Diese Zellen befanden sich nur am Rand des Kallus. In den Chondrozyten-Regionen waren keine Immunzellen zu finden. Im Gegensatz zum nativen Knochen war die Zellzahl der B-Lymphozyten an Tag 7 nach der Fraktur stark erhöht.

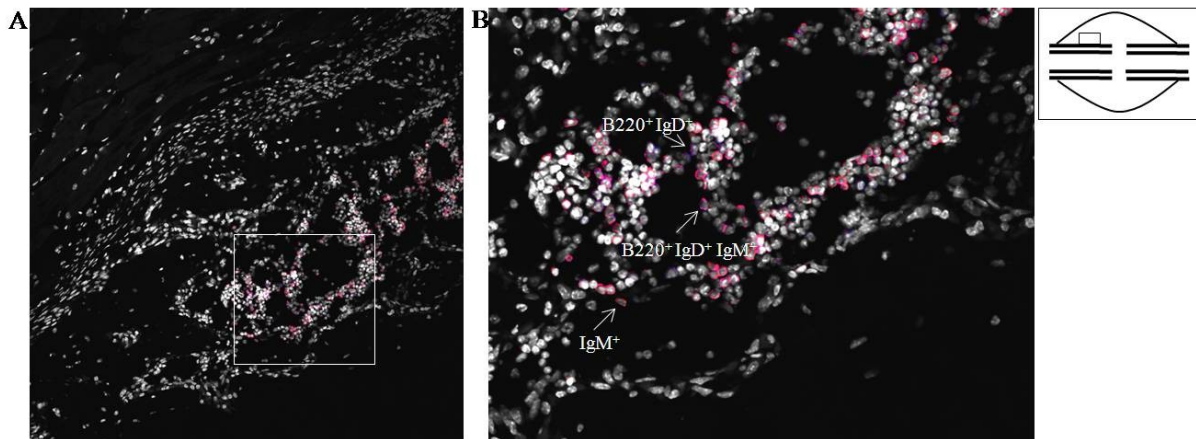


Abb. 41: Nachweis der B-Lymphozyten im Kallus an Tag 7 post Fraktur. Die B-Lymphozyten befanden sich in Clustern fern der Chondrozyten. IgM^+ , $B220^+ IgD^+$, $B220^+ IgD^+ IgM^+$

Die Darstellung der Einzelbilder zeigte deutlich, dass einige Zellen doppelt oder dreifach positiv waren (Abb. 42). An Tag 14 nach dem Setzen der Fraktur befanden sich im Kallusbereich sehr viele $B220^+ IgD^+ IgM^+$ Zellen, die bis an den Knorpel heranreichten

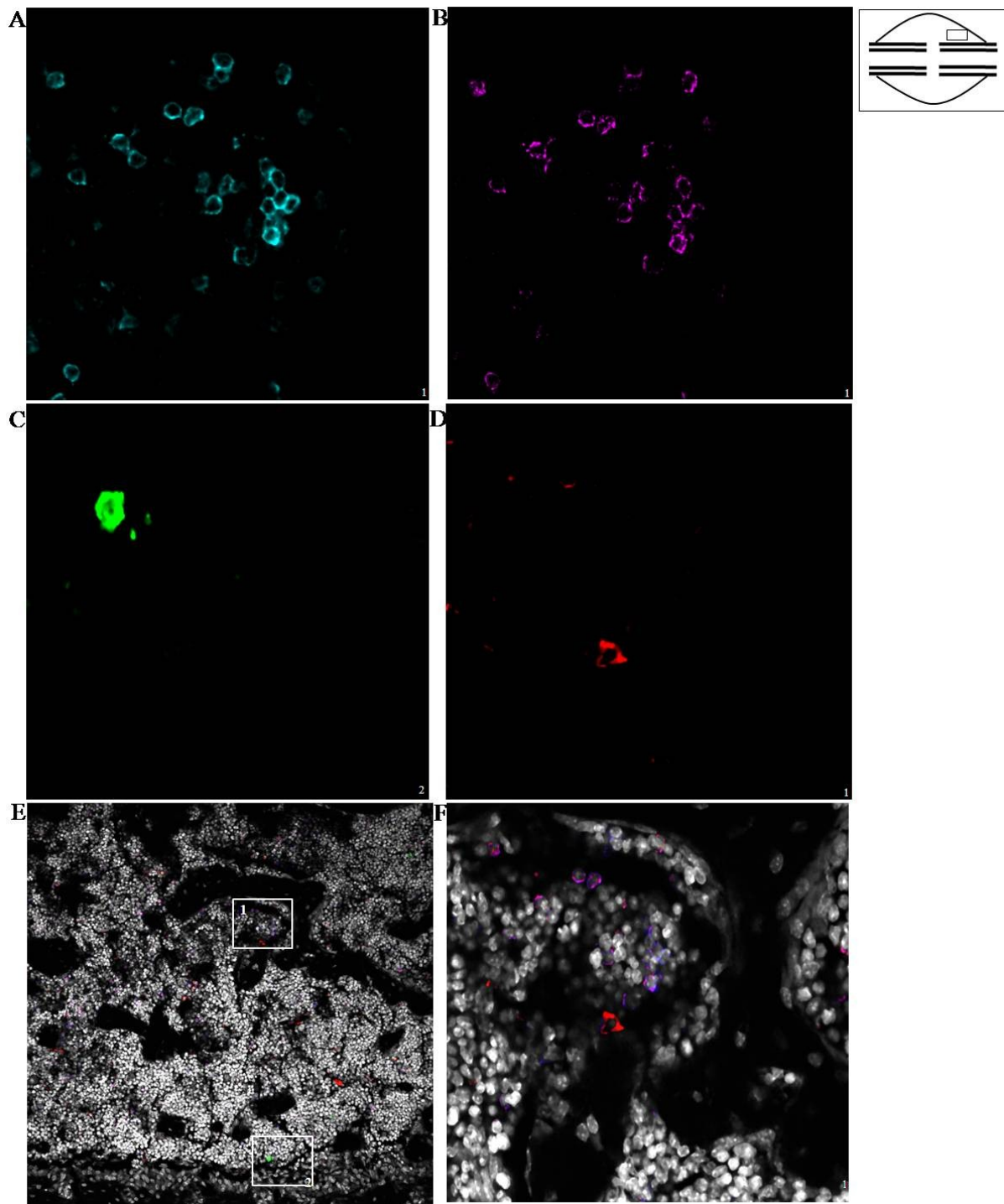


Abb. 42: Frakturkallus 14 Tage post Fraktur. Darstellung der B-Lymphozyten in Einzelbildern (A) B220, (B) IgD, (C) IgG und (D) IgM. E zeigt, aus welchem Bereich des Frakturkallus die vergrößerten Bilden A-D kamen. Eine Überlappung der in A, B und D dargestellten Einzelbilder ist in Teilbild F dargestellt.

An Tag 21 konnten auch Plasmazellen im Kallus detektiert werden, wovon die meisten IgM⁺ waren, wenige Zellen waren IgG positiv. Naive Zellen konnten zu diesem Zeitpunkt kaum noch gefunden werden.

Im Frakturkallus befanden sich nur wenige T-Lymphozyten

Auch hier wurde die Anfärbung der T-Lymphozyten wie bei den nativen Knochen durchgeführt. Die Schnitte wurden mit den Antikörpern für B220, CD3, CD4 und Laminin gefärbt.

In den WT Tieren konnten an Tag 3 nach der Fraktur noch keine T-Lymphozyten gefunden werden. Der Kallus begann sich erst herauszubilden. An Tag 7 waren ebenso kaum T-Lymphozyten im Kallus der Tiere zu finden. T-Lymphozyten konnten nur endostal im Knochenmark gefunden werden. Hier lagen sie vereinzelt zwischen den B220 positiven B-Lymphozyten vor. Die Lamininstruktur hingegen war deutlich ausgeprägt. Laminin konnte um die gesamten Muskelfasern, welche den Knochen umgaben, gefunden werden und umgab auch einzelne Zellverbände (Abb. 43).

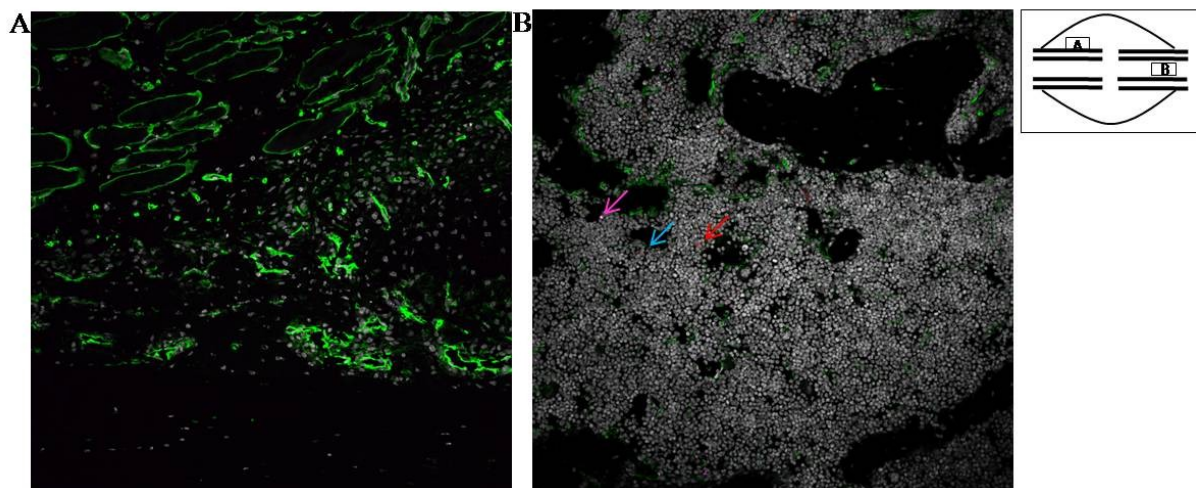


Abb. 43: Nachweis der T-Lymphozyten im WT an Tag 7 nach der Fraktur am Rand des Kallus (A) und im Knochenmark (B). Am Rand des Kallus waren keine T-Lymphozyten zu finden, nur im Knochenmark lagen vereinzelt T-Zellen vor; B220, CD3, CD4, Laminin

Zum Tag 14 infiltrierten sehr viele Lymphozyten den Kallus (siehe Abb. 44). Sie befanden sich jedoch noch immer nicht in der Region der Chondrozyten. Hauptsächlich B-Lymphozyten lagen in Verbänden am Kallusrand vor. Dazwischen konnten vereinzelt T-Lymphozyten ausgemacht werden. Diese waren in der Mehrzahl CD4 positiv. CD8 positive Zellen konnten so gut wie nicht detektiert werden. Deutlich zu erkennen waren die zwischen den Zellen verlaufenden Lamininstrukturen. Einige einsprossende Gefäße konnten mit Laminin angefärbt werden.

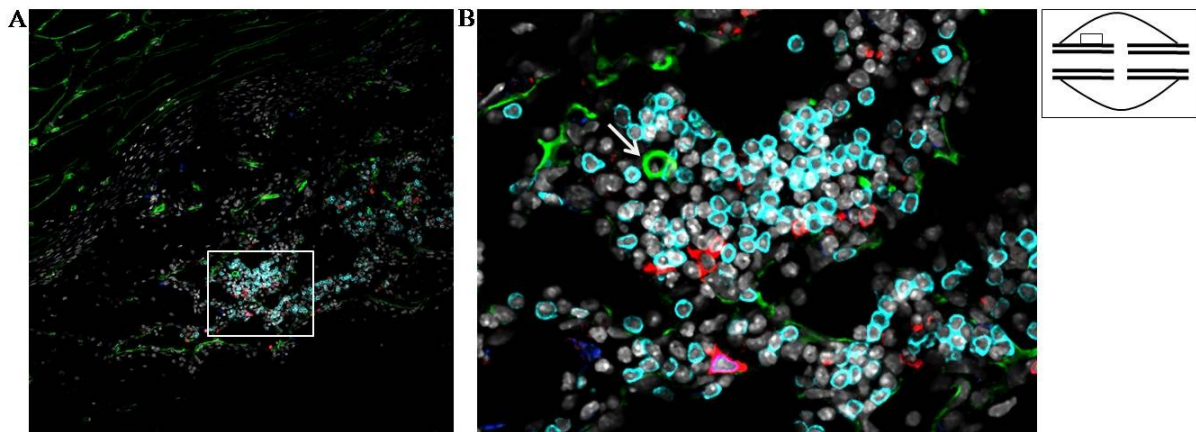


Abb. 44: Tag 14 nach Setzen der Fraktur. Der periostale Kallus des Wildtyps wurde von Immunzellen infiltriert und zeigt bereits erste Gefäßeinsproßungen. Gefäße sind mit einem weißen Pfeil markiert; B220; CD3; CD4; Laminin

Der neue Knochen der $RAG1^{-/-}$ Tiere war fast ausschließlich von Laminin umgeben und kleinere Gefäße an Tag 7 sichtbar. In der Chondrozytenregion befanden sich keine Lamininstrukturen. Zum Tag 14 hin wurden auch Knochenmarkszellen vom Laminin umspannt und Laminin trat deutlicher als an Tag 7 hervor. An Tag 21 befand sich Laminin auch in den zuvor durch Chondrozyten besetzten Regionen, dort war die Anfärbung aber schwach ausgeprägt. Generell nahm die Lamininanfärbung im gesamten Knochen ab (Abb. 45A-C).

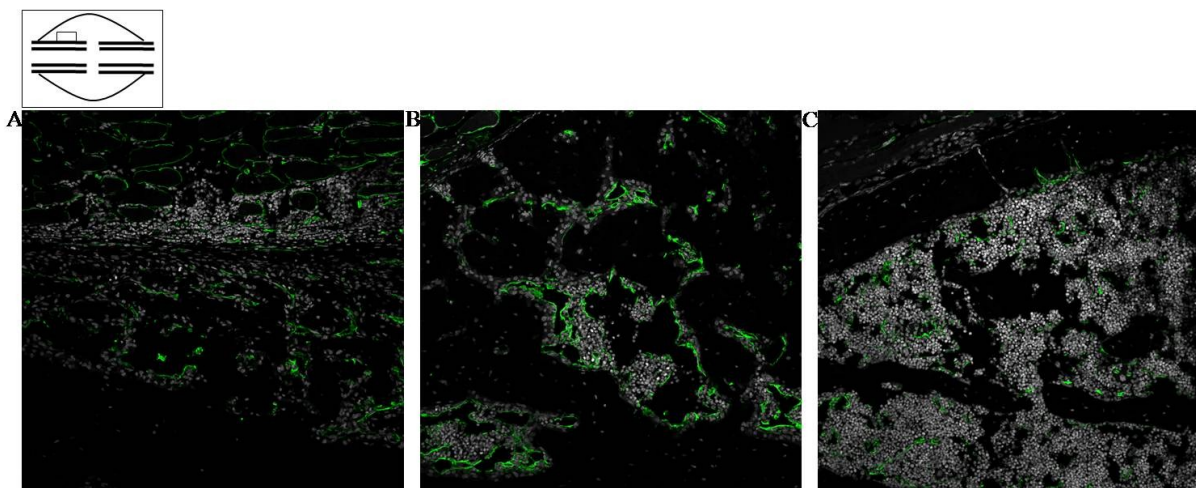


Abb. 45: Verteilung der Lymphozyten und des Lamininnetzwerks im Kallus der $RAG1^{-/-}$ Tiere an Tag 7 (A), Tag 14 (B) und Tag 21 (C). Weder B- noch T-Lymphozyten konnten nachgewiesen werden; B220, CD3, CD4, Laminin

Mehr Osteoklasten im Kallus der $RAG1^{-/-}$ Tiere

Zusätzlich zu den Lymphozyten wurden in diesem Versuch Kathepsin K für Osteoklasten und F4/80 für Makrophagen gefärbt.

Zum Beginn der Frakturheilung an Tag 3 nach Setzen der Fraktur konnten keine Osteoklasten im Kallus des WTs nachgewiesen werden. Vereinzelt befanden sich Makrophagen endostal in der Nähe des Frakturspalts. Da am Tag 7 der Kallus zumeist aus Chondrozyten bestand, konnten Osteoklasten nur vereinzelt am Rand des Kallus gefunden werden, wo bereits eine Knochenneubildung begonnen hatte (Abb. 46A-C).

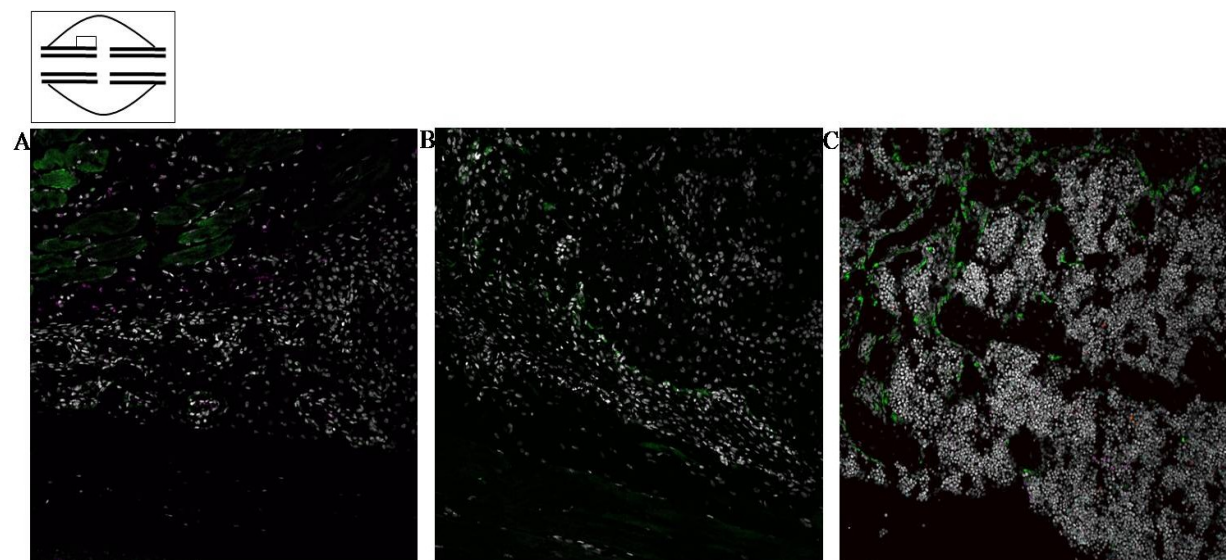


Abb. 46: Nachweis von Osteoklasten und Makrophagen im WT an Tag 7 (A) und Tag 21 (C) am Kallusrand und an Tag 14 (B) im Knorpelbereich. Im Knorpelbereich konnten keine Immunzellen detektiert werden, lediglich an Tag 21 waren einige wenige Zellen zu erkennen. B220, CD3, Kathepsin K, F4/80

Am Kallusrand und im Knochenmark hingegen umrandeten die Osteoklasten den neu gebildeten Knochen und lagen in räumlicher Nähe zu B- und T-Lymphozyten (Abb. 47). Zwischen den Lymphozyten waren noch vereinzelt Makrophagen zu finden, deren Zahl aber rückläufig war. Zum Tag 21 hin veränderten sich die Osteoklastenzahlen nicht. Auch die Zahl der B-Lymphozyten blieb in etwa gleich. Die Anzahl der T-Lymphozyten schien im Knochenmark abzunehmen.

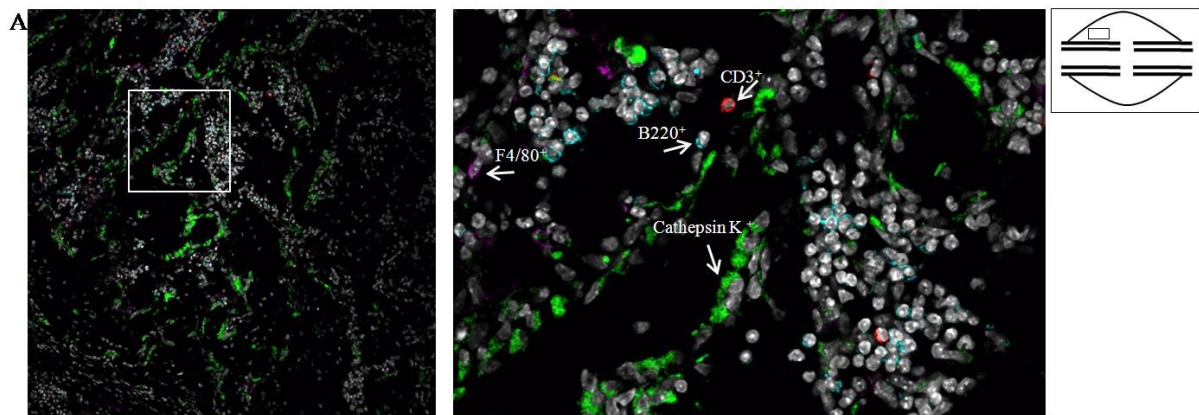


Abb. 47: Nachweis der Osteoklasten im WT an Tag 14 nach Setzen der Fraktur am Kallusrand. Deutlich erkennbar war die räumliche Nähe zwischen den Immunzellen und den Osteoklasten, die den neuen Knochen umrandeten. Makrophagen traten nur vereinzelt auf. B-Lymphozyten machten den Hauptteil der Lymphozyten aus. B220, CD3, Kathepsin K, F4/80

In den $RAG1^{-/-}$ Tieren wurden an Tag 3 ebenfalls nur wenige Osteoklasten gefunden. Diese befanden sich zumeist periostal am sich bildenden Kallus. Auch waren kaum Makrophagen detektierbar. Eine starke Einwanderung von Osteoklasten fand zum Tag 7 statt. Hier befanden sich sehr viel mehr Osteoklasten, die den neuen Knochen umgaben, im Kallus als in den WT Tieren. Es befanden sich in den Bereichen in denen Knorpelzellen vorkommen keine anderen Zellen, weder Immun- noch Knochenzellen (Abb. 48).

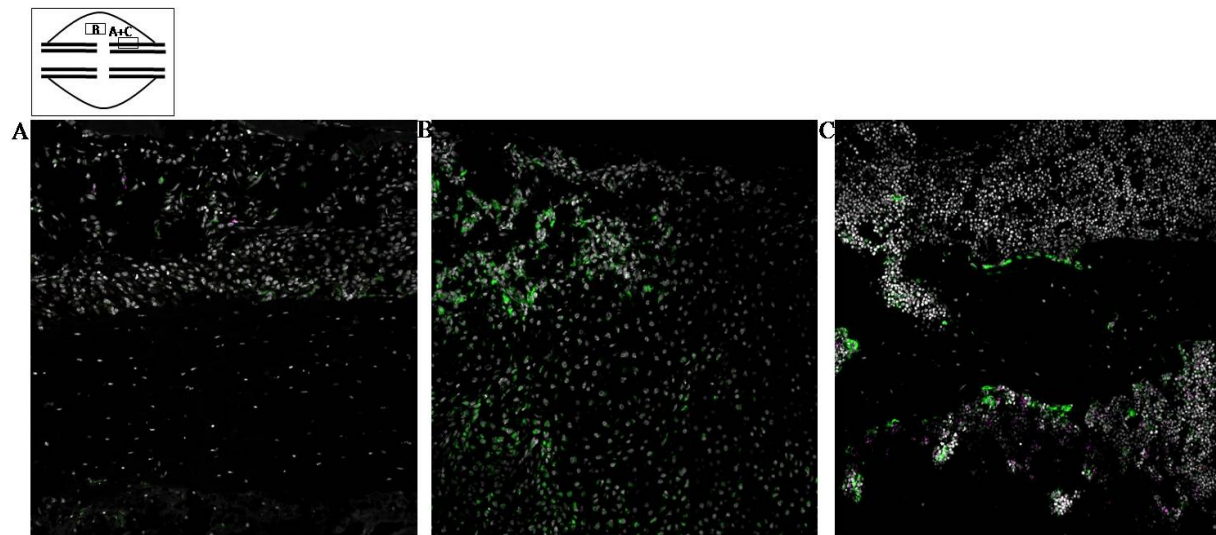


Abb. 48: Nachweis der Osteoklasten in den $RAG1^{-/-}$ Tieren an Tag 7 (A) und 21 (C) am Kallusrand und an Tag 14 nahe der Chondrozyten (B). Osteoklasten befinden sich nicht in der Chondrozytenregion reichen aber nahe heran. Es wurden viel mehr Osteoklasten als im WT gefunden. B220, CD3, Kathepsin K, F4/80

An Tag 14 zeigte sich am Kallusrand (Abb. 49) das gleiche Bild wie an Tag 7. Sehr viele Osteoklasten umrandeten den neu gebildeten Knochen. Es wurden aber mehr Makrophagen als an Tag 7 beobachtet. Zum Tag 21 nahm die Anzahl der Osteoklasten im Kallus der Tier ab

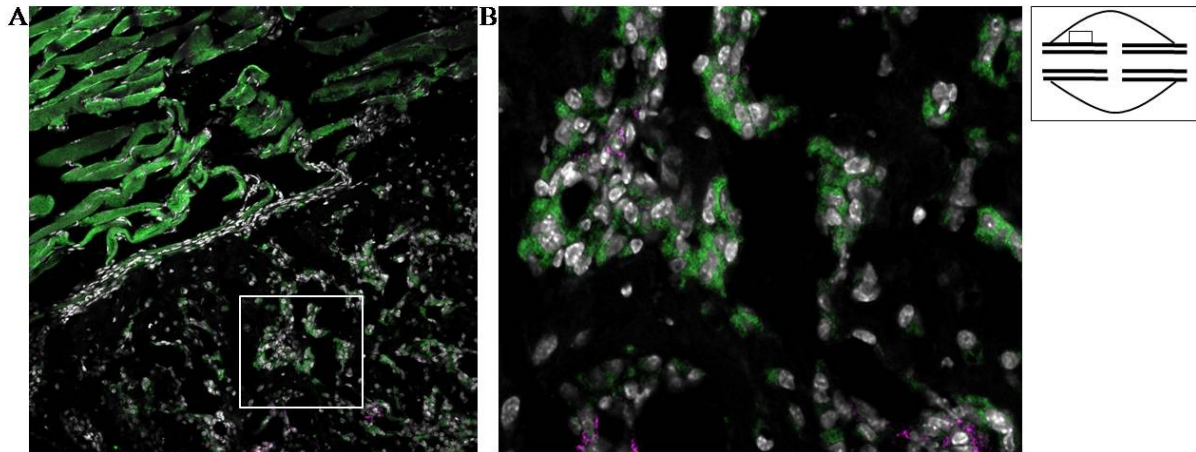


Abb. 49: Nachweis der Osteoklasten in den RAG1^{-/-} Tieren an Tag 14 am Kallusrand. B220, CD3, Kathepsin K, F4/80

Osteoblasten umrandeten den neu gebildeten Knochen und befanden sich in Nähe der B-Lymphozyten

Auch die Osteoblasten und ihre Lokalisation bezüglich der Lymphozyten wurden untersucht. Dafür wurden der Osteoblasten-spezifische Marker Osteokalzin genutzt, sowie die bekannten Marker B220 und CD3 für die Lymphozyten.

Die Osteoblasten befanden sich am Tag 3 frakturnah am sich bildenden Kallus (Abb. 50). Sie waren die einzige der untersuchten Zellpopulationen, die in einem so frühen Stadium der Frakturheilung auftrat. Endostal befanden sich sehr viele Osteoblasten im Knochenmark, besaßen jedoch noch nicht die für aktive Osteoblasten typische Palisadenstruktur. An Tag 7 befanden sich die Osteoblasten im periostalen Kallus eher an den Kortizes als am neu gebildeten Knochen. Sie reichten bis an die Chondrozyten heran.

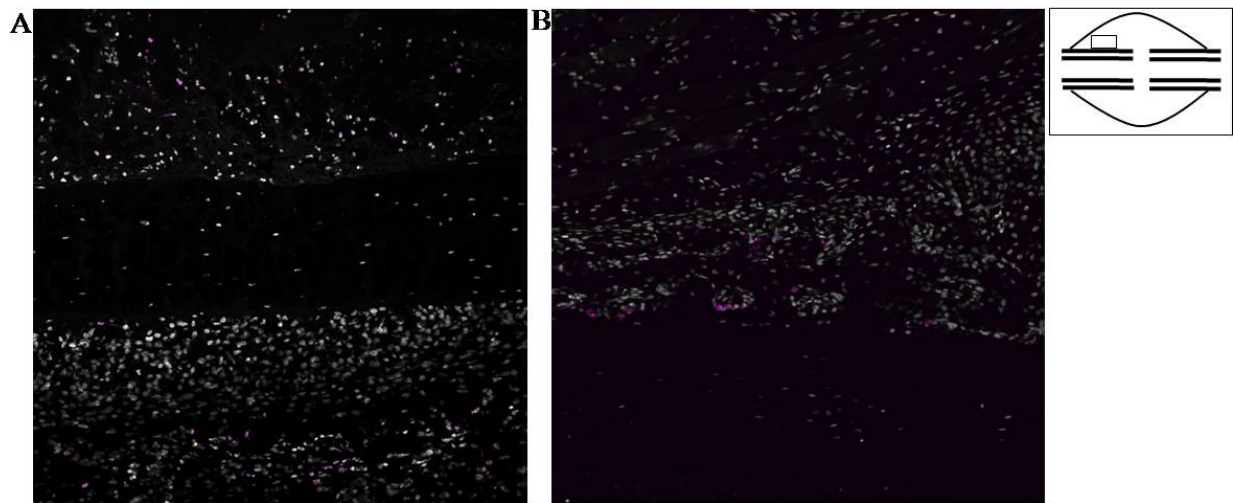


Abb. 50: Nachweis von Osteoblasten im WT an Tag 3 (A) und Tag 7 (B), Osteokalzin, B220, CD3, eosinophile Granulozyten

Zwischen 7 und 14 Tagen hatte eine massive Vermehrung der Osteoblasten stattgefunden (Abb. 51). Sie reichten vom Kallusrand bis in die Chondrozytenregion und umrandeten den neuen Knochen. Dazwischen befanden sich viele B220 positive Zellen, die Cluster bildeten. Die Osteoblasten hatten zu diesem Zeitpunkt immer häufiger die Struktur aktiver Osteoblasten.

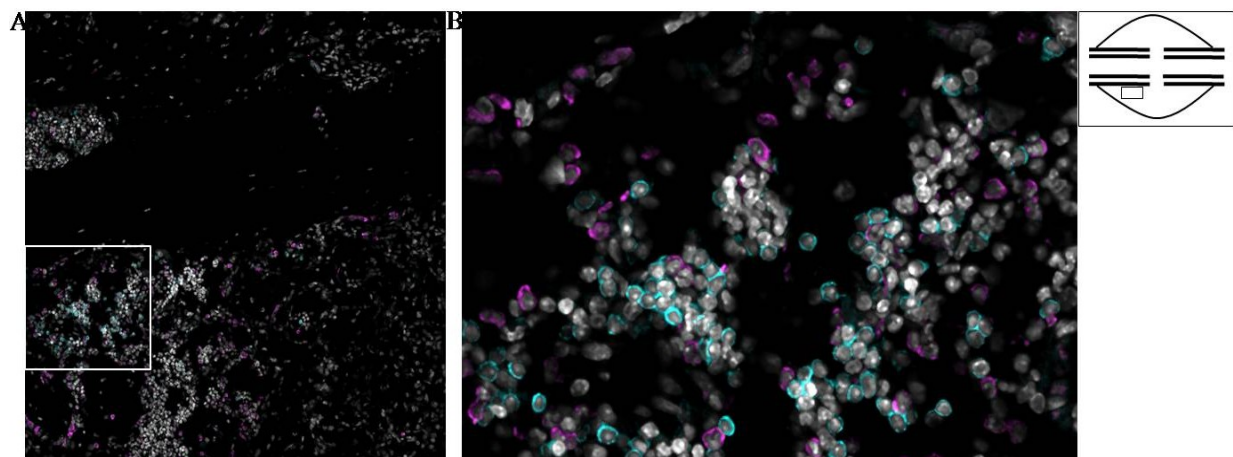


Abb. 51: Nachweis der Osteoblasten im WT an Tag 14 am Kallusrand; Osteokalzin, B220, CD3, eosinophile Granulozyten

Die Zahl der Osteoblasten nahm zum Tag 21 ab, die Palisadenstruktur blieb aber erhalten (Abb. 52).

Eosinophile Granulozyten waren zu allen Zeitpunkten nur vereinzelt zu erkennen. Meist traten sie nur im Knochenmark auf.

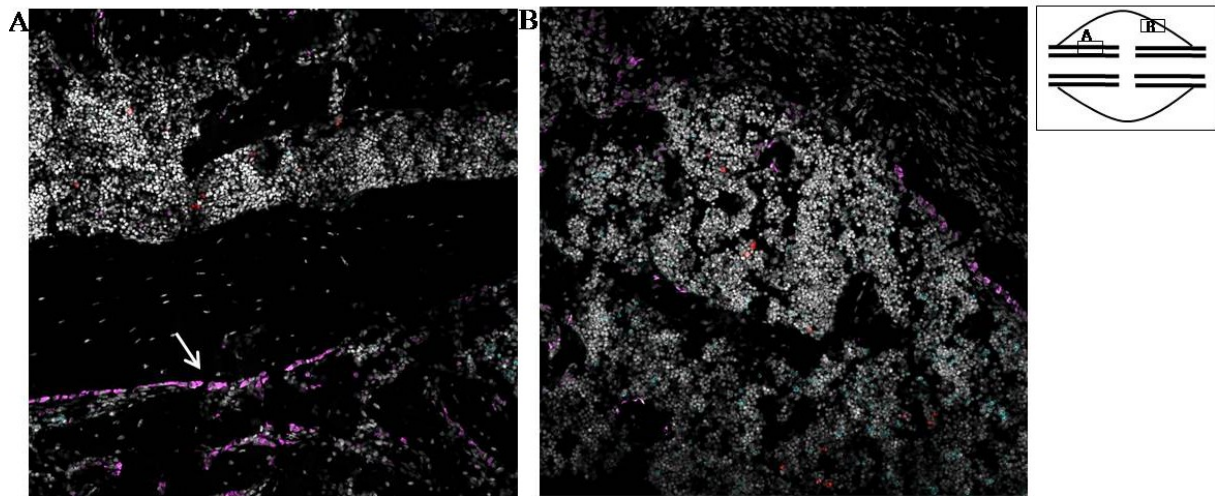


Abb. 52: Nachweis der Osteoblasten an Tag 21 im WT an den Kortizes (A) und am Rand des Kallus (B); Osteokalzin, B220, CD3, eosinophile Granulozyten

In den $RAG1^{-/-}$ Tieren waren an Tag 3 weniger Osteoblasten zu finden. Sie lagen nur ganz vereinzelt im Knochenmark vor. Die Zahl der Osteoblasten nahm zum Tag 7 nach der Fraktur deutlich zu. Die Osteoblasten reichten auch hier bis an die Chondrozyten heran. Eosinophile Granulozyten konnten am Rand des Kallus beobachtet werden. Ihre Zahl unterschied sich jedoch nicht von der in den WT Tieren. Auch zum Tag 14 stieg die Zahl der Osteoblasten weiterhin an. Sie umrundeten auch hier den neu gebildeten Knochen und waren zahlenmäßig mehr als im WT (Abb. 53).

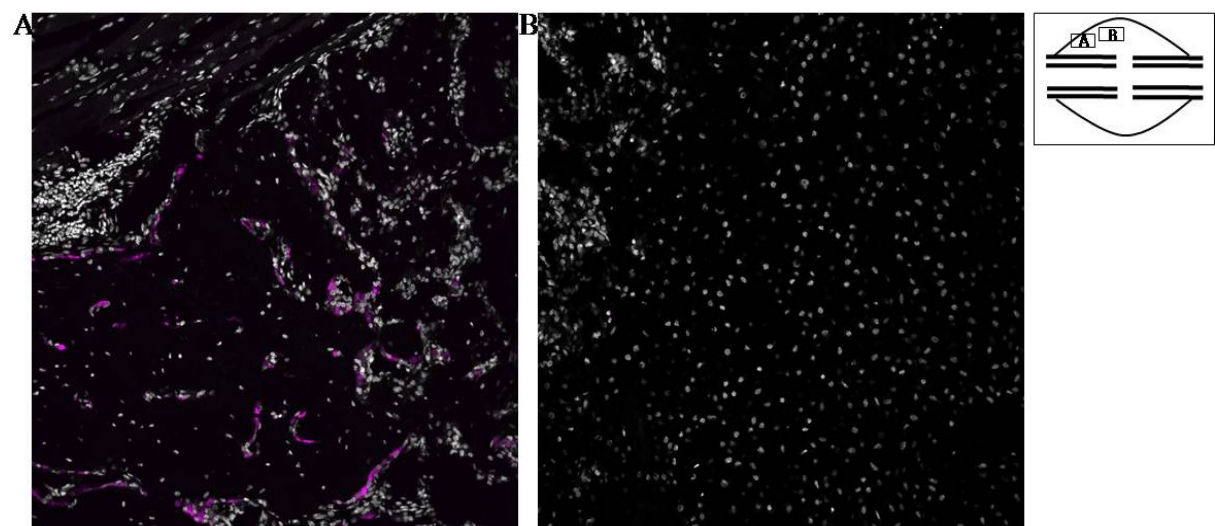


Abb. 53: Nachweis der Osteoblasten in den $RAG1^{-/-}$ Tieren an Tag 14 im Kallus (A) und Knorpelbereich (B) der Mutante; Osteokalzin, B220, CD3, eosinophile Granulozyten

Die höchste Osteoblastenzahl wurde am Tag 21 in den RAG1^{-/-} Tieren erreicht (Abb. 54), sie lag aber unter der Anzahl der Osteoblasten im WT zu diesem Zeitpunkt. Die Osteoblasten befanden sich an der Oberfläche fast aller neuen Geflechtknocheninseln. Sie hatten die für ihre aktive Form charakteristische Palisadenstruktur angenommen.

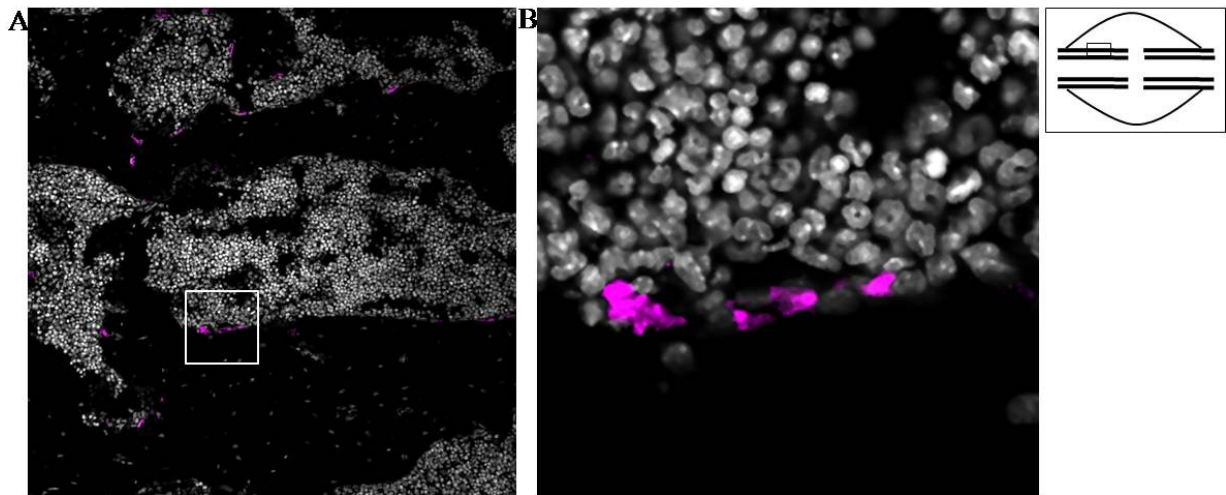


Abb. 54: Nachweis der Osteoblasten am Tag 21 in der Mutante; Osteokalzin, B220, CD3, eosinophile Granulozyten

3.5 Molekularbiologische Untersuchungen

3.5.1 Unterschiede in der Expression von Kollagen I und X zwischen den Versuchsgruppen

Die qRT-PCR wurde durchgeführt um die relative Expression einiger Gene genau zu bestimmen. Dafür wurde die mRNA aus dem Frakturkallus der Versuchstiere isoliert und einer PCR Reaktion unterzogen. Dabei beziehen sich die Ergebnisse auf Cyclophilin A, das zuvor getestete „House keeping gene“.

Die Ergebnisse (Abb. 55) zeigten, dass Kollagen I das am stärksten exprimierte Gen war. Im WT zeigte sich die stärkste Expression an Tag 7 nach der Fraktur, anschließend nahm die Expression stark ab. In den Mutanten hingegen blieb die Expression von Kollagen I über den gesamten Untersuchungszeitraum stabil. Kollagen X zeigte in beiden Gruppen dieselbe Regulation der Expression. Die Expression nahm zwischen Tag 7 und 14 zu und zum Tag 21 wieder ab. Wobei die Expression von Kollagen X in den Mutanten erhöht war. Zu allen Untersuchungszeitpunkten war die Expression von OPG in der Mutante höher als im WT.

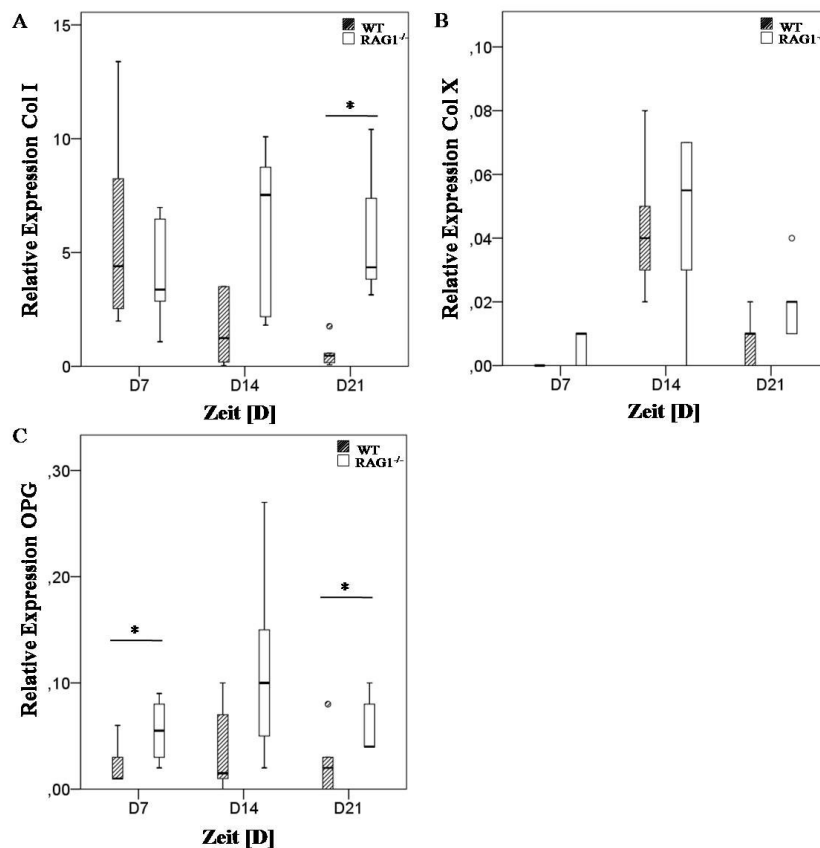
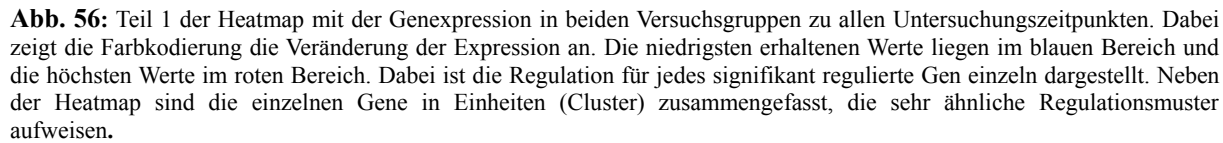


Abb. 55: QRT-PCR der Gene Kollagen I (A), Kollagen X (B) und OPG (C). Angegeben ist die relative Expression der Gene zu den unterschiedlichen Versuchszeitpunkten. $p < 0,05$

3.5.2 Kaum Veränderungen der Expression der Kollagene in der Mutante

Bei der Transkriptomanalyse handelt es sich um eine Methode, die es ermöglicht alle zu einer bestimmten Zeit von einer Zelle synthetisierten mRNA-Moleküle zu quantifizieren. Sie wurde in dieser Arbeit eingesetzt um unterschiedliche Genexpressionsmuster im Heilungsverlauf der untersuchten Versuchsgruppen zu detektieren und damit Rückschlüsse auf unterschiedliche Heilungsverläufe und die daran beteiligten Gene zuzulassen. Die Transkriptomanalyse wurde an allen Untersuchungszeitpunkten und je zusätzlich in einem nativen Tier, ohne Fraktur, durchgeführt. Zunächst wurde die Genexpression über den Heilungsverlauf in den einzelnen Versuchsgruppen verglichen. Stellte sich dabei eine signifikante Veränderung der Expression eines Gens durch die Fraktur in den WT heraus und war dieses Gen auch in den RAG1^{-/-} Tieren signifikant unterschiedlich reguliert, wurde es in die Auswertung einbezogen. In Abbildung 56 und 57 sind die Ergebnisse der Analyse graphisch dargestellt. Dabei ergab sich eine Clusterung der einzelnen, signifikant unterschiedlich exprimierten Gene in 8 Gencluster, deren Regulation ähnlich verlief. Diese wurden anschließend einzeln mittels DAVID Bioinformatics funktionell geclustert.



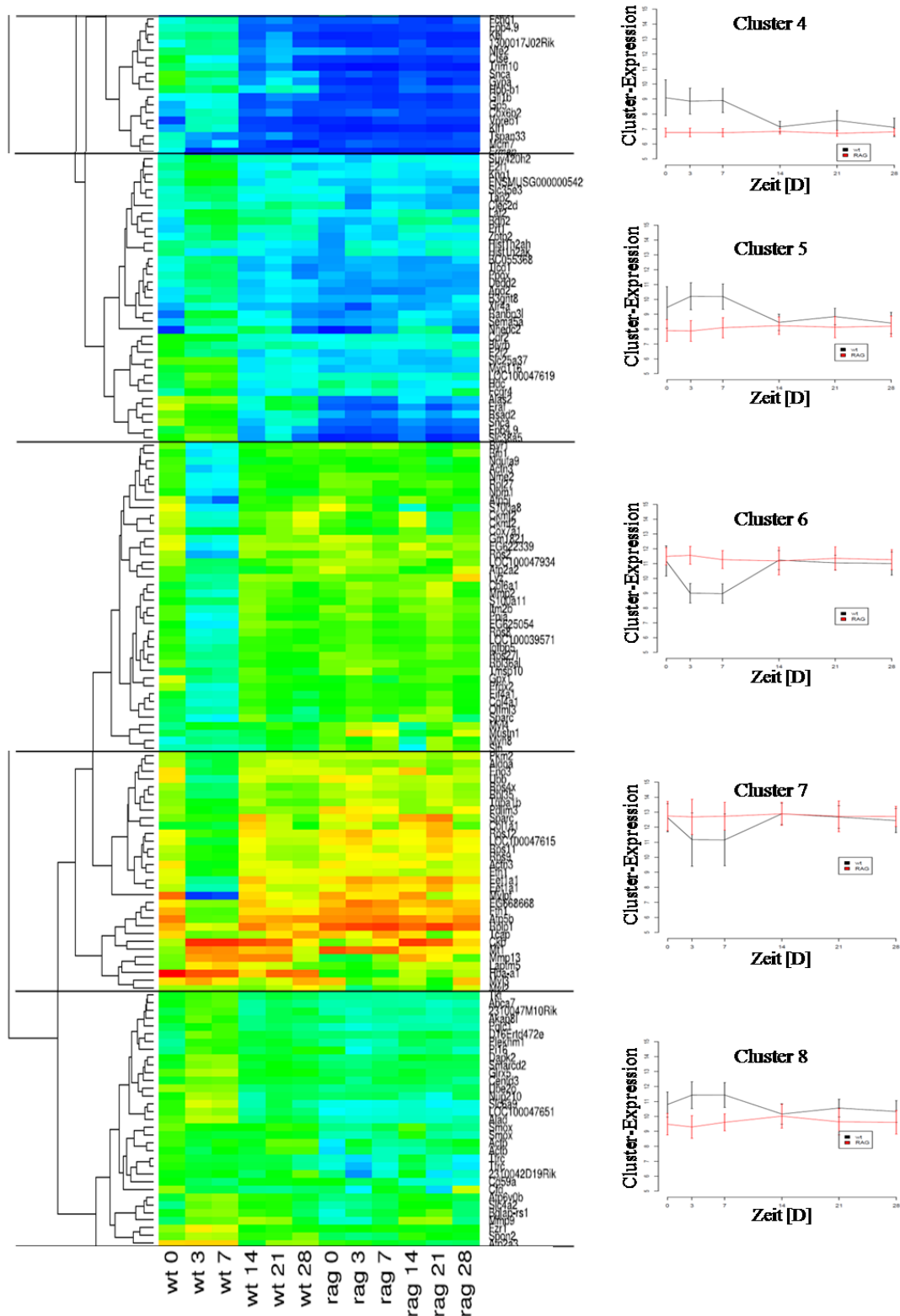


Abb. 57: Teil 2 der Heatmap mit der Genexpression in beiden Versuchsgruppen zu allen Untersuchungszeitpunkten. Dabei zeigt die Farbkodierung die Veränderung der Expression an. Die niedrigsten erhaltenen Werte liegen im blauen Bereich und die höchsten Werte im roten Bereich. Dabei ist die Regulation für jedes signifikant regulierte Gen einzeln dargestellt. Neben der Heatmap sind die einzelnen Gene in Einheiten (Cluster) zusammengefasst, die sehr ähnliche Regulationsmuster aufweisen

Im Cluster eins zeigte sich in den RAG1^{-/-} Tieren kaum eine Veränderung in der Genexpression, sie nahm leicht über den gesamten Heilungsverlauf ab, war jedoch signifikant unterschiedlich zu Tag 0. In den WT Tieren hingegen zeigte sich eine starke Abnahme der Expression der meisten Gene zum Tag 3 und hielt bis Tag 7 nach Fraktur an. Anschließend nahm die Expression der Gene wieder zu und blieb bis zum Ende der Frakturheilung stabil. Dieses Cluster beinhaltet 19 verschiedene funktionelle Cluster, zu denen die zellulären Komponenten der Mitochondrien gehören, die für die Herstellung von Metaboliten und die Bereitstellung von Energie verantwortlich sind. Ebenso sind es Gene, die für Ionen-Transporte, die Translation und den Transport von Proteinen, die Makromolekül-Synthese und verschiedene katabolische Prozesse benötigt werden. BMP1 (bone morphogenetic protein 1) ist eines der zu diesem Zeitpunkt am stärksten regulierten Proteine der Knochenbildung und Ossifikation. Es wird benötigt um die Pro-kollagene I, II und III zu modifizieren und so die Bildung von Knorpel und Knochen zu induzieren. Des Weiteren konnte C3 als ein signifikant unterschiedlich reguliertes Gen gefunden werden. Dieses ist als Teil des Komplementsystems ein Vermittler der lokalen Inflammation und besitzt eine B-Zell stimulierende Wirkung. Auch Gene für den programmierten Zelltod wurden zwischen den Versuchsgruppen unterschiedlich exprimiert.

Im Cluster 2 fiel die Genexpression der Gene in den Wildtypen wieder zum Tag 3 hin ab und behielt diese bis zum Tag 7 bei. Darauf folgte ein Anstieg der Expression zum Tag 14. In den RAG1^{-/-} Tieren kam es ebenfalls zu einem Anstieg der Genexpression, sie unterlag jedoch nicht den Schwankungen wie im WT. Die Gene in diesem Cluster gehören zur Transkription und Translation, sowie zu verschiedenen mitochondrialen Prozessen.

Das Cluster 3 umfasst nicht sehr viele Gene. Auch hier kam es wieder zu einer Rückregulation in der Expression der Gene in den Wildtypen, die zwischen Tag 3 und 7 nach der Fraktur anhielt. Anschließend erfolgte ein starker Anstieg der Genexpression, die nach Tag 14 wiederum abnahm. In der Mutante steigerte die Genexpression sich langsam bis Tag 7, fiel anschließend an Tag 14 ab und steigerte sich im restlichen Heilungsverlauf wieder. Viele der Gene in diesem Cluster stehen in Verbindung zu Chondrozyten. Dabei handelt es sich beispielsweise um Crtap (cartilage associated protein) und um Col2a1, welche von Chondrozyten synthetisiert werden. Col2a1 (Kollagen 2a1) wird zu Beginn der enchondralen Ossifikation exprimiert und aktiviert zusammen mit Sox9 (Sry-related HMG box 9) die

Kollagen II Synthese. Ebenso zeigte sich Col9a2 als ein signifikant exprimiertes Gen, welches ein Strukturprotein des hyalinen Knorpels ist.

Die Expression der in Cluster 4 zusammengefassten Gene war zu jedem Zeitpunkt in der Mutante geringer als im WT. Die hier enthaltenen Gene führen zur Hämatopoese, Klf1 (erythroid Kruppel-like factor) beispielsweise ist ein Transkriptionsregulator bei der Entwicklung von Erythrozyten. Des Weiteren befinden sich in diesem Cluster Gene zur Aufrechterhaltung der Homöostase der Zellen und Gene, die bei der Entwicklung des Immunsystems und der lymphoiden Organe eine Rolle spielen. Dazu gehört Vpreb1 (pre-B lymphocyte 1), welches wichtig für die Bildung des prä-BCR auf den pre-B-Lymphozyten ist und die Genumlagerung zur reifen B-Zelle reguliert.

Cluster 5 zeigte eine sehr ähnliche Genregulation wie Cluster 4. Aber alle Gene in diesem waren generell stärker exprimiert. Sie sind beteiligt an Zelltod und Apoptose, sowie der Chromosomenorganisation und der Transports verschiedener Ionen. Als ein signifikant exprimiertes Gen stach Prf1 (pore forming protein) heraus. Es stammt aus den Granula von T-Lymphozyten und inhibiert deren Aktivität. Als Bestandteil des Komplementsystems kann es aber auch Zielzellen lysieren.

Im Cluster 6 konnte keine funktionelle Genclusterung vorgenommen werden.

Auch das Cluster 7 zeigte eine generell hohe Genexpression, wobei die Expression in der RAG1^{-/-} Versuchsgruppe höher war als im WT. In diesem Cluster sind viele Gene anabolischer und katabolischer Prozesse, wie der Glykolyse zusammengefasst. Es befinden sich aber auch Gene der Ossifikation und Knochenbildung unter ihnen, dabei handelt es sich um Colla1, welches im Knochen vorkommt und Mmp13 (matrix metalloproteinase 13), das Kollagen I wiederum degradiert und eine Rolle in der enchondralen Ossifikation spielt.

Das letzte Cluster beinhaltete Gene der Kalzium-, Metall- und Ionenbindung. Des Weiteren befinden sich in diesem Cluster Bglap-rs1 (bone gamma-carboxyglutamate protein, related sequence 1), welches 1-2 % der gesamten Knochenproteine ausmacht und Mmp9, welches die Kollagene IV und V schneidet und vermutlich eine Rolle bei der Knochenresorption spielt. Mmp9 zeigte in der Mutante einen früheren Anstieg der Genexpression als der WT. Im RAG1^{-/-} erfolgte eine verstärkte Expression ab Tag 7, im WT erst ab dem Tag 14 nach der Fraktur.

3.6 Zellbiologische Differenzierung

Mit Hilfe der zellbiologischen Untersuchungen sollten eventuelle Unterschiede zwischen den mesenchymalen Stammzellen der WT- und der RAG1^{-/-} Tiere detektiert werden, die zu einem Unterschied im Heilungsverlauf führen könnten.

3.6.1 Die MSCs des Wildtypstamms bildeten weniger Filopodien aus und besaßen schlankere Zellkörper

Zunächst wurde die Morphologie der MSCs beider Versuchsgruppen betrachtet. Dazu wurde Knochenmark in eine Zellkulturflasche gegeben und die adhärennten Zellen kultiviert. Dabei war ersichtlich, dass sich die MSCs beider Versuchsgruppen voneinander unterschieden. Die MSCs des WTs hatten lange schmale Zellkörper, einen kleinen Kern und bildeten nur wenige Filopodien aus. Die MSCs aus den RAG1^{-/-} Tieren besaßen einen größeren Zellkörper, der eher eine ovale Struktur aufwies und nicht lang gestreckt war. Ebenso bildeten diese MSCs mehr Filopodien aus (Abb. 58).

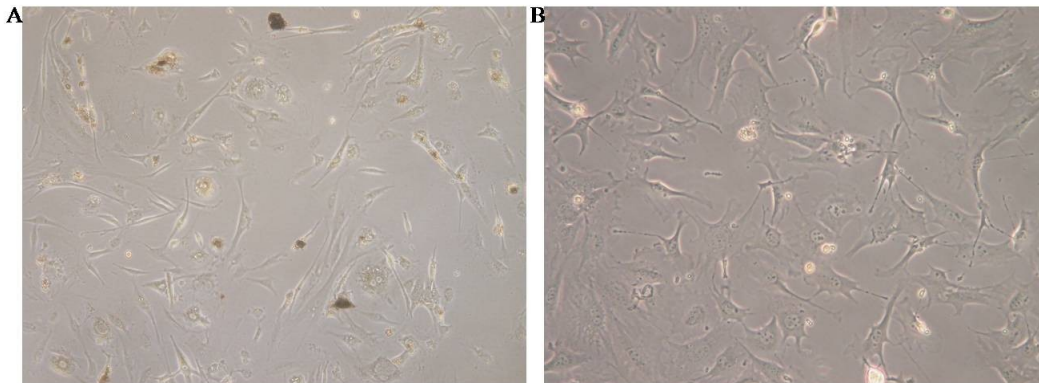


Abb. 58: Morphologische Charakterisierung der MSCs im WT (A) und im RAG1^{-/-} (B). Die Zellen des WTs wiesen einen länglichen schmalen Zellkörper auf, während dieser in der Mutante eher oval und kurz war.

3.6.2 Diffusere Ablagerung von Kalzium-Ionen in den osteogen differenzierten Zellen der RAG1^{-/-} Tiere

Um das Differenzierungs- und Mineralisierungspotential der MSCs von WT und RAG1^{-/-} Tieren zu untersuchen wurde eine osteogene Differenzierung der MSCs durchgeführt. Dazu wurden die Zellen in einem Well ausgesät und in Differenzierungsmedium kultiviert. Nach 16 und 21 Tagen erfolgte die Auswertung mittels Von Kossa- und Alizarin Rot S- Färbung.

Von Kossa Färbung

Mit der Von Kossa-Färbung ist es möglich die Mineralablagerungen der Zellen nachzuweisen. Dabei wird das Kalzium in Phosphaten und Karbonaten gegen Silberionen ausgetauscht und zu metallischem Silber reduziert. So erscheinen die mineralisierten Bereich schwarz.

Tag 16

Am Tag 16 der Differenzierung war ein Unterschied in der Menge der Ablagerungen zu erkennen. Im WT war die Ablagerung über das ganze Well verteilt und erschien recht dünn schichtig. Im $RAG1^{-/-}$ hingegen erkannte man starke Ablagerungen, die sich allerdings nicht über das gesamte Well erstreckten (Abb. 59).

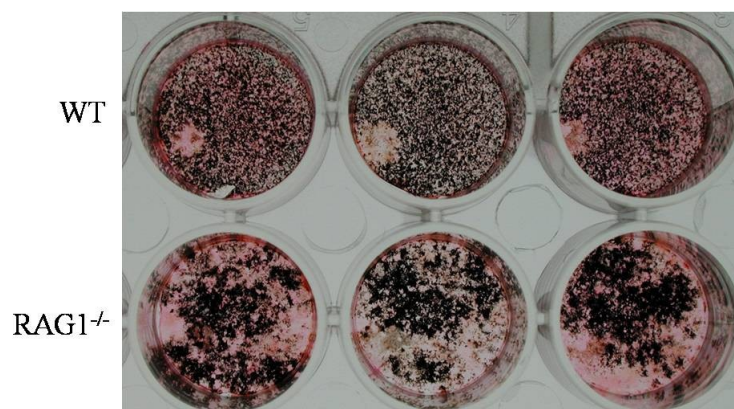


Abb. 59: Übersicht der Von Kossa Färbung an Tag 16 der Differenzierung. Man erkennt deutlich die Unterschiede bezüglich der Ablagerungen der Zellen des WT und der Mutante. Die Ablagerung hat im WT in allen Wells über die gesamte Fläche stattgefunden, während sie in der Mutante nicht die ganze Fläche einnahm. Dennoch ist die Anfärbung in der Mutante scheinbar stärker.

Tag 21

Die Ablagerung nahm in beiden Versuchsgruppen zum Tag 21 der Differenzierung zu. Sie fand durch die Zellen des WTs wie an Tag 16 über die gesamte Fläche der Wells statt und nahm in ihrer Intensität zu. Auch durch die Zellen der Mutante war die Ablagerung zu diesem Zeitpunkt im gesamten Well ersichtlich. Unterschiede waren jedoch zu erkennen. Die Ablagerung in der Mutante war stärker als im WT. Die Anfärbung schien massiver zu sein und eine gröbere Struktur aufzuweisen (Abb. 60).

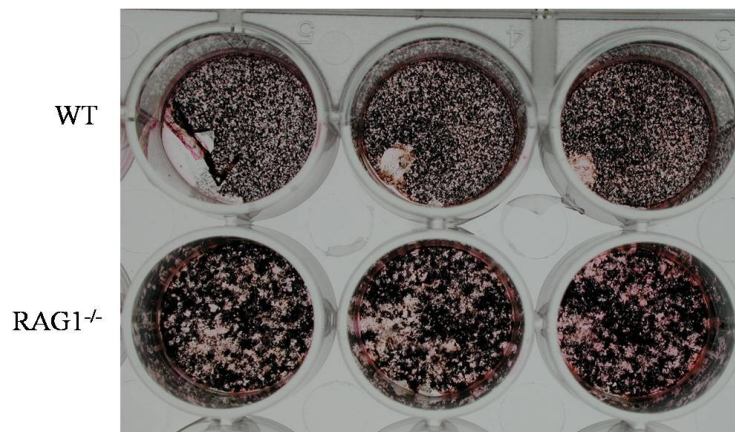


Abb. 60: Übersicht der Von Kossa Färbung an Tag 21 der Differenzierung. In beiden Versuchsgruppen ist eine Ablagerung über das gesamte Well zu erkennen. Die Anfärbung ist in der Mutante jedoch nicht so fein wie im Wildtypen, sondern wirkt stärker.

Alizarin Rot-S Färbung

Alizarin Rot bildet mit zweiwertigen Kationen, wie Kalzium, Chelatverbindungen, die farbig erscheinen. Der Farbstoff kann wiederum mittels Cetylpyridiniumchlorid herausgelöst und photometrisch bestimmt werden.

Tag 16

Die Alizarin Rot S-Färbung zeigte ebenso wie die Von Kossa Färbung eine stattgefundene Mineralablagerung durch die differenzierten Zellen des WT (Abb. 61).

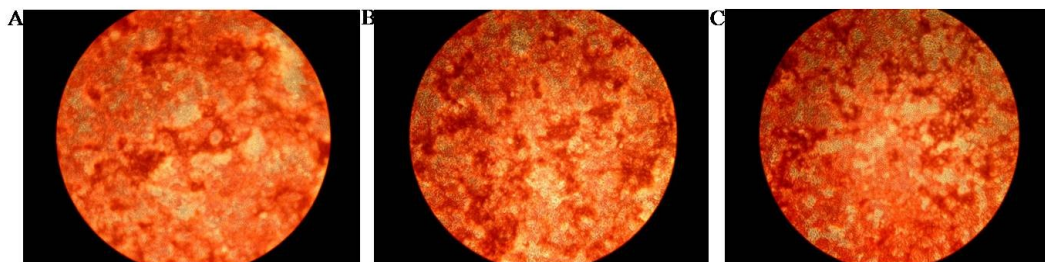


Abb. 61: Übersicht über die Alizarin Rot S Färbung an Tag 16 im WT (A-C). Man erkennt, wie in der Von Kossa-Färbung, dass eine Ablagerung der extrazellulären Matrix stattgefunden hat.

In den differenzierten Zellen der $RAG1^{-/-}$ Tiere erschien die Ablagerung wie in der Von Kossa-Färbung stärker als im WT. Im Unterschied zum WT waren aber auch hier in der Mutante wieder nur Teile des Wells mit Ablagerungen bedeckt (Abb. 62).

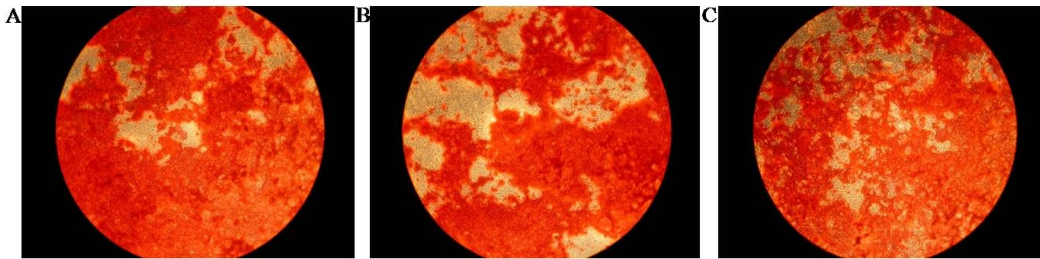


Abb. 62: Übersicht der Alizarin Rot S-Färbung in der Mutante (A-C). Die Ablagerung scheint auch hier stärker zu sein als im WT.

Tag 21

An Tag 21 zeigte sich nur noch ein schwacher Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen. Die Ablagerungen im WT befanden sich im gesamten Well, wohingegen die Ablagerung im Rag1^{-/-} Tier zunächst stärker aussah, sich aber nicht gefärbte Bereiche im Well befanden. Dies wurde durch die photometrische Messung bestätigt. In beiden Fällen befanden sich in etwa gleich viele Zellen in den Wells und auch die gemessene optische Dichte in alle Wells war sehr ähnlich (Abb. 63).



Abb. 63: Übersicht über die Alizarin Rot S-Färbung an Tag 21 der Differenzierung im WT und der Mutante.

3.7 Untersuchung weiterer Knock-out Tiere

Da unterschiedliche Heilungsverläufe in WT- und im RAG1^{-/-} Tieren beobachtet wurden, sollte die Untersuchung weiterer knock-out Tiere, für jeweils eine Lymphozytenpopulation (B- oder T-Lymphozyten) zeigen, welche der beiden Zellpopulationen für die Unterschiede in WT- und RAG1^{-/-} Tieren verantwortlich war oder nur das Fehlen beider Lymphozytenpopulationen zu diesen Unterschieden führte.

3.7.1 Beta-delta knock-out Tiere zeigten an Tag 7 einen ähnlichen Heilungsstatus wie die RAG1^{-/-} Tiere

Bei dieser Versuchsgruppe handelte es sich um Tiere, die keine T-Lymphozyten besaßen. Durch einen knock-out in den Genen für die beta- bzw. die delta-Kette des T-Zell-Rezeptors, waren die T-Lymphozyten in diesen Mäusen nicht in der Lage einen funktionsfähigen Rezeptor zu exprimieren und gingen aufgrund fehlender Überlebenssignale in Apoptose. Die histologische Anfärbung mit Movat Pentachrom 7 Tage nach der Fraktur, zeigte einen deutlich ausgebildeten Kallus, der im Vergleich zum WT etwas kleiner war. Der überwiegende Teil des Kallusgewebes bestand aus hypertrophen Chondrozyten, proliferierende Knorpelzellen konnten nur in Einzelfällen beobachtet werden. Einige Bereiche hypertrophen Knorpels wiesen bereits eine Verknöcherung auf. Eine Bildung von Geflechtknochen an den Kortizes hatte zu diesem Zeitpunkt bereits begonnen. Zur spezifischeren Detektion von Knorpel wurde eine Alcianblau-Färbung durchgeführt. Auch in dieser Färbung zeigte sich, dass der überwiegende Teil des Kallus aus Chondrozyten besteht. In der Safranin-O/Von Kossa-Färbung konnte eine Mineralisierung des Knorpelgewebes nachgewiesen werden (Abb. 64).

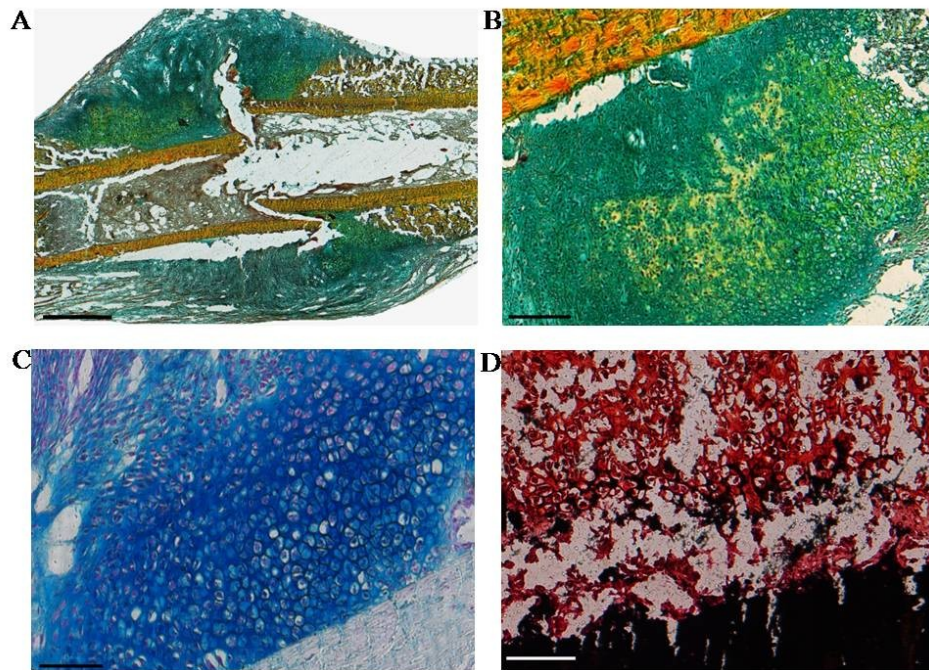


Abb. 64: Übersicht der angefertigten Färbungen des Frakturkallus 7 Tage nach der Fraktur. Die Anfärbung mit der Movat Pentachrom Färbung (A-B) zeigte eine begonnene Geflechtknochenbildung und eine beginnende Ossifikation des Knorpels. Der hypertrophe Knorpel wurde mit der Alcianblau-Färbung (C) nachgewiesen und die Mineraleinlagerungen waren in der Safranin O/Von Kossa-Färbung (D) zu erkennen. Maßstab (A) 2mm; (B-D) 100µm

Weniger Knorpel und mehr Knochen in den $\beta\delta$ knock-out Tieren im Vergleich zum WT

Die histomorphometrische Analyse der Movat Pentachrom gefärbten Schnitte erfolgte mit derselben Software, wie die Auswertung von WT und RAG1^{-/-}. Dabei zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den prozentualen Anteilen von knöchernem Gewebe und Knorpel zwischen den drei Versuchsgruppen. Der WT zeigte den geringsten prozentualen Anteil an knöchernem Gewebe am Tag 7 nach der Fraktur, während die Anteile in RAG1^{-/-} und beta-delta knock-out Tieren sehr nah beieinander lagen. Beim prozentualen Anteil an Knorpelgewebe zeigte sich das gleiche Ergebniss, auch hier lagen RAG1^{-/-} und beta-delta Tiere nah beieinander, der WT wies in diesem Fall, jedoch die größten Mengen Knorpel auf (Abb. 65).

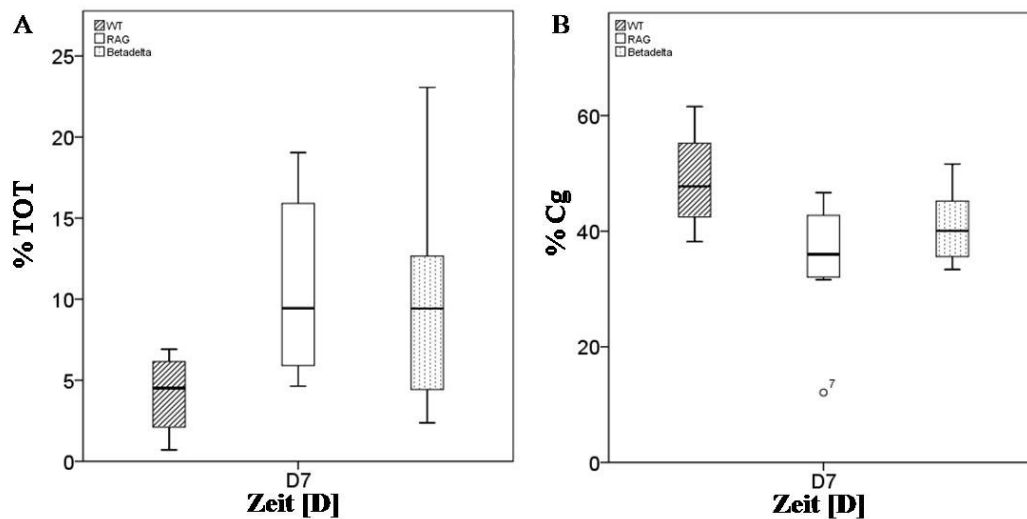


Abb. 65: Graphische Darstellung der histomorphometrischen Auswertung der drei Versuchsgruppen. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen gefunden werden. RAG1^{-/-} und beta-delta Tiere zeigten sehr ähnliche Werte beim Anteil knöchernen Gewebes und bei Knorpel. Der WT hingegen wies die geringste knöcherne, aber die höchste Knorpelfläche auf. TOT= knöchernes Gewebe; Cg= Knorpel

3.7.2 JHT knock-out Tiere ähneln im Heilungsstatus den Wildtyp Tieren

Die JHT knock-out Tiere besitzen keine reifen B-Lymphozyten. Somit war es mit dieser Versuchsgruppe möglich den Einfluss der T-Lymphozyten auf die Frakturheilung näher zu untersuchen. Die histologischen Färbungen in diesen Tieren zeigten einen größeren Kallus als die restlichen Versuchsgruppen zum 7 Tage Zeitpunkt. Hier war der Kallus ebenfalls mit Knorpel gefüllt, auch wenn dieser zu gleichen Teilen aus proliferierenden und hypertrophen Zellen bestand. Die hypertrophen Knorpelzellen begannen zu verknöchern. Um die Knorpelzellen herum, befand sich aber viel Bindegewebe, welches in den anderen Versuchsgruppen nicht beobachtet werden konnte. Eine beginnende Geflechtknochenbildung wurde an allen 4 Frakturrenden beobachtet (Abb. 66).

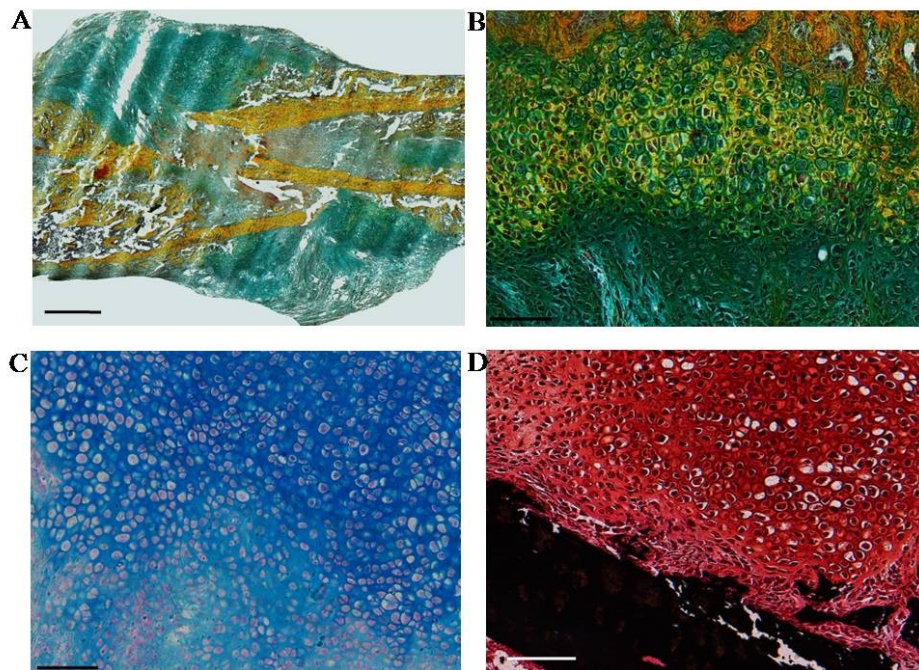


Abb. 66: Färbung des Frakturkallus mit Movat Pentachrom (A-B), Alcianblau (C) und Safranin O/Von Kossa (D) in den JHT knock-out Tieren am siebenten Tag nach der Fraktur. Die Kallusbildung ist deutlich zu erkennen. Der Kallus besteht aus proliferierenden und hypertrophen Chondrozyten, welche begannen zu verknöchern. Ebenso konnte eine Geflechtknochenbildung beobachtet werden. Maßstab (A) 2mm; (B-D) 100µm; $p^* < 0.05$

Tiere ohne B-Lymphozyten wiesen an Tag 7 der Heilung ähnlich viel Knochen und Knorpel auf wie die Tiere des WT

Bei der histomorphometrischen Analyse der JHT Tiere im Vergleich zu den anderen drei Versuchsgruppen zeigte sich ein signifikant niedrigerer Anteil knöchernen Gewebes am Gesamtkallus, sowohl zwischen JHT und beta-delta knock-out ($p = 0,049$), als auch zwischen den JHT und den $RAG1^{-/-}$ Tieren ($p = 0,016$). WT und JHT Tiere unterschieden sich kaum im Hinblick auf knöchernes Gewebe. Bei der Betrachtung des Knorpelanteils ergaben sich keine Signifikanzen zwischen den Versuchsgruppen. Ein Trend zeigte sich beim Vergleich der Knorpelmasse zwischen JHT und $RAG1^{-/-}$ Tieren ($p = 0,059$), wobei die JHT Tiere weniger Knorpel aufwiesen. WT und JHT wiesen etwa gleich viel Knorpel auf (Abb. 67).

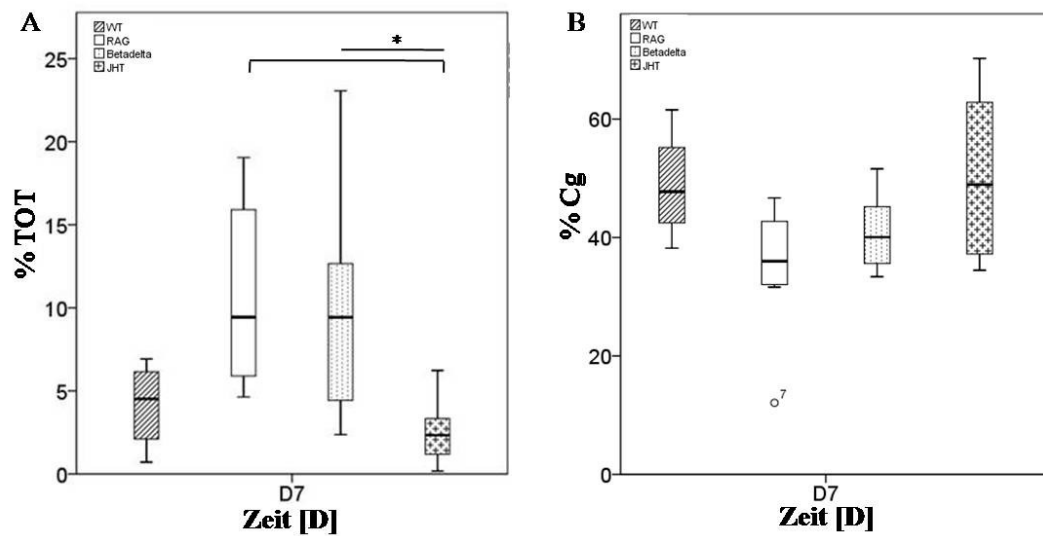


Abb. 67: Graphische Darstellung der histomorphometrischen Analyse zum prozentualen Anteil von verknöchertem Gewebe und Knorpel. Signifikant mehr knöchernes Gewebe konnte sowohl in den RAG1^{-/-} Tieren als auch in den beta-delta Tieren verglichen mit den JHT-Mäusen gefunden werden. Hinsichtlich des Knorpels ergaben sich keine signifikanten Veränderungen, wobei WT und JHT-Tiere mehr Knorpel aufwiesen als die anderen beiden Versuchsgruppen. TOT= verknöchertes Gewebe; Cg= Knorpelgewebe; p* < 0.05

4 Diskussion

Die Regeneration des Knochens nach einer Fraktur ist eine teilweise immer noch unbekannte Abfolge biologisch komplexer Prozesse. Diese erfordern sowohl intrazelluläre als auch extrazelluläre Signale^{4,31}, dazu gehören lokale sowie systemische Regulatoren, Wachstumsfaktoren, Chemokine, Differenzierungsfaktoren, Hormone und Zytokine. Diese interagieren mit verschiedenen Zellen des Knochens, aber auch mit Zellen des Immunsystems. Zusätzlich dazu tragen Kortex, Periost, Knochenmark und das umliegende Weichgewebe zur Heilung bei.

Die Frakturheilung startet immer mit einer inflammatorischen Kaskade, in der ein Hämatom entsteht. Die Chemokine IL1, IL6 und TNF- α sind in dieser Phase die wichtigsten ihrer Art und locken weitere Zellen an den Ort des Geschehens⁷⁶. Zur gleichen Zeit sorgt eine Ausschüttung von TGF- β für den Start der Frakturheilung, indem es die Migration und Proliferation der mesenchymalen Stammzellen stimuliert. Von inflammatorischen Zellen sekretierte BMPs stimulieren eine Differenzierung der MSCs sowohl in osteogene als auch chondrogene Richtung. Zellvorläufer des Periosts beginnen zu differenzieren und Geflechtknochen zu bilden. Nachdem durch die Entstehung eines knorpeligen Kallus eine Stabilität der Fraktur erreicht wurde, werden die Chondrozyten hypertroph und verknöchern. Anschließend gehen sie in Apoptose und die Matrix wird gleichzeitig durch Osteoblasten weiter mineralisiert. Die letzte Phase der Heilung umfasst das Remodeling, durch welches der Geflechtknochen in Lammellenknochen umgebaut und die natürliche Struktur des Knochens wiederhergestellt wird.

Aber nicht jeder Patient, der mit einer Fraktur im Krankenhaus erscheint, zeigt diesen Heilungsverlauf. Etwa 10% aller Frakturen¹ zeigen eine verzögerte Heilung, einige von ihnen heilen überhaupt nicht. Die Gründe dafür sind bis heute nicht vollständig geklärt. Es häufen sich jedoch die Indizien dafür, dass das Immunsystem bei diesen Patienten eine Rolle spielen könnte. Dabei stehen immer öfter die Zellen des adaptiven Immunsystems im Fokus. Versuche zur Wundheilung und Frakturheilung bei HIV-positiven Patienten zeigten veränderte Heilungsmuster bei unterschiedlichen Voraussetzungen des Immunsystems^{79,80}.

Daher sollte in dieser Arbeit der Einfluss des adaptiven Immunsystems auf die Frakturheilung in der Maus genauer untersucht werden. Dafür wurde die RAG1^{-/-} Maus als etabliertes knock-out Modell, welches keine reifen B- und T-Lymphozyten besitzt⁴⁹, eingesetzt.

4.1 Der Einfluss der Immunzellen auf den Knochenmetabolismus

Bevor die Frakturheilung in den beiden Versuchsgruppen untersucht wurde, wurde mittels FACS Analyse und immunhistologischen Färbungen die Zellzusammensetzung in den einzelnen Tieren überprüft. Damit sollten eventuell vorhandene Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen und ihr potentieller Einfluss auf den Heilungsverlauf herausgearbeitet werden.

In normalen C57Bl6 Wildtyp Mäusen sind etwa ein Drittel aller Milzzellen B220 positiv und stellen einen sehr frühen Vorläufer der B-Lymphozyten dar. Im Knochenmark dieser Mäuse sind es etwa ein Viertel aller Zellen⁴⁹. Für die T-Lymphozyten wurde der Oberflächenmarker CD3 gewählt. Dieser befand sich in der Milz auf 31,5% aller Lymphozyten, während es im Knochenmark nur etwa 3% waren. Dabei waren 35% dieser Zellen zusätzlich CD4 positiv und somit T-Helferzellen und 40% CD8 positive zytotoxische T-Lymphozyten.

Auch in den immunhistologischen Färbungen konnten diese Zellen nachgewiesen werden. Im Knochenmark der Tiere befanden sich sehr viele B220 IgM und IgD positive reife, aber noch naive B-Lymphozyten⁷³. Die Mehrheit der B220 positiven Zellen war jedoch nur IgM positiv. Den FACS Daten entsprechend fanden sich im Knochenmark der Tiere mehr CD4 als CD8 positive T-Lymphozyten.

Beide Lymphozyten-Populationen konnten in den Schnitten der RAG1^{-/-} Tiere nicht nachgewiesen werden. In den FACS Untersuchungen des Knochenmarks wurden aber 8% der Lymphozyten als B220 positiv detektiert. Diese waren zumeist CD25 negativ. Auch in Milz und Blut wurden diese Zellen gefunden. Bereits Mombaerts⁴⁹ fand diese Zellen bei seiner ursprünglichen Charakterisierung der RAG1^{-/-} Tiere. Er zeigte zusammen mit seinem Team bei der ersten Charakterisierung der RAG1^{-/-} Mutante, dass es keinen phänotypischen Unterschied zum WT gab, die lymphatischen Organe der Tiere aber sehr klein waren. Es konnten nur $3,4 \times 10^6$ Thymozyten im Thymus der RAG1^{-/-} Tiere gefunden werden. Im WT dagegen

waren es 230×10^6 Zellen⁴⁹. Die Zusammensetzung der lymphatischen Populationen war der einer SCID Maus sehr ähnlich⁸¹.

B220 ist ein sehr früher Marker in der Entwicklung der B-Lymphozyten, und da in den $RAG1^{-/-}$ Tieren nur die Rekombinase RAG1 fehlt, können sich Lymphozyten bis zu einem Stadium entwickeln, welches vor dem Einsatz der Rekombinase liegt. Dabei handelt es sich bei den T-Lymphozyten um das DN3 (doppel negativ 3) Stadium in dem die Zellen $CD3^{-}CD25^{+}$ ^{51,82,83} sind. B-Lymphozyten stoppen in ihrer Entwicklung, wenn sie B220 positiv, aber CD25 negativ sind^{52,58}. Viele dieser Zellen wurden mittels FACS nachgewiesen. Diese frühen B220 positiven Zellen sind in der Lage zu Osteoklasten zu differenzieren, wie Studien an $Pax5^{-/-}$ Mäusen zeigten⁸⁴. Möglicherweise reifen die B220 positiven Vorläuferzellen, da sie keine reifen B-Lymphozyten werden konnten, in den $RAG1^{-/-}$ Tieren zu Osteoklasten heran. Dies wäre eine mögliche Erklärung für die erhöhten Osteoklastenzahlen im Knochenmark der nativen Tiere. Auch zeigten die immunhistologischen Färbungen der Knochen im Frakturheilungsprozess früher mehr Osteoklasten in den $RAG1^{-/-}$ Tieren. Gleichzeitig waren aber weniger Osteoblasten sichtbar. Dieses Verhältnis von weniger Osteoblasten und mehr Osteoklasten in den nativen Knochen der $RAG1^{-/-}$ Tiere deutet auf einen Knochenmetabolismus hin, der eher in Richtung Knochenresorption geht.

Die biomechanischen Untersuchungen in der Doktorarbeit von Jan Frisch (2011) zeigten keinen Unterschied in der Knochendichte beider Versuchsgruppen. Dieser Befund war sehr interessant, da andere Deletionsmodelle zeigten, dass T-Lymphozyten defiziente Tiere eine verringerte Anzahl an Osteoblasten aufwiesen und daher einen osteoporotischen Phänotyp besaßen⁸⁵. Auch B-Zell defiziente Tiere wiesen diesen Phänotyp auf. Eine mögliche Erklärung dafür wäre das mit acht Wochen noch sehr junge Alter der Versuchstiere. Die maximale Knochendichte wird in Mäusen erst nach etwa 16 Wochen erreicht und nimmt anschließend ab⁸⁶. Bei den 8 Wochen alten $RAG1^{-/-}$ Versuchstieren zeigte sich aber die bereits beschriebene Veränderung der Osteoblasten- und Osteoklastenzahlen gegenüber den Wildtyp Tieren, die auf eine beginnende Abnahme der Knochendichte schließen lassen.

Über die Expression von OPG und RANKL sind Lymphozyten und Osteoblasten in der Lage Osteoklasten zu beeinflussen⁸⁷. Dabei wird RANKL von aktivierten B- und T-Lymphozyten, sowie Osteoblasten sekretiert. Dieses bindet an RANK auf Osteoklasten und stimuliert deren

Differenzierung und Aktivierung. Wird hingegen OPG von aktivierten B-Lymphozyten oder Osteoblasten sekretiert, werden Differenzierung und Aktivierung inhibiert. Bei der Deletion einer Lymphozyten-Population entwickeln die Tiere eine Osteoporose, die sich in den untersuchten Tieren andeutete, aber aufgrund des jungen Alters der Versuchstiere noch nicht so ausgeprägt war. In den hier untersuchten $RAG1^{-/-}$ Tieren fehlen sogar beide Lymphozyten-Populationen. Da also sowohl RANKL als auch OPG sekretierende Zellen fehlen und die Produktion ausschließlich durch die Osteoblasten erfolgt, könnte sich das Gleichgewicht zwischen Knochenauf- und -abbau auf einem anderen Niveau einregulieren. Aber es fehlen auch inflammatorische und anti-inflammatorische Signale, die während der Frakturheilung im WT vorkommen. Demnach sind diese Unterschiede, das Fehlen der Lymphozyten und die erhöhten Osteoblasten- sowie Osteoklastenzahlen, maßgeblich für die Unterschiede im Ablauf und dem Erfolg der Frakturheilung.

4.2 Osteoblasten- und Osteoklastenzahlen zeigten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen

Die Quantifizierung der Osteoblasten und Osteoklasten wurde im Kallus der Tiere vorgenommen, um eventuelle Unterschiede zwischen der Anzahl der Zellen an den einzelnen Untersuchungszeitpunkten zu detektieren. Dazu wurde eine TRAP Färbung der Osteoklasten und eine Osteokalzin Färbung der Osteoblasten vorgenommen.

Bei der Auszählung der Osteoblasten pro μm Knochenoberfläche im Wildtyp ergab sich ein Anstieg der Menge an Osteoblasten von Tag 7 bis Tag 21 nach der Fraktur. Anschließend erfolgte zum Tag 28 eine starke Abnahme der Osteoblastenzahlen. Bei der Betrachtung des Kallus und der darin befindlichen Gewebe, wurde deutlich, dass der beginnende Anstieg der Osteoblasten mit der beginnenden Ossifikation des Kallus einherging. Die maximale Knochenmenge wurde am Tag 21 nach der Fraktur erreicht und nahm darauf folgend ab. Dies sah man ebenfalls an den abnehmenden Osteoblastenzahlen von Tag 21 zu Tag 28 im Wildtyp. Zwischen Tag 21 und 28 ging der Kallus in die Remodeling Phase über. In beiden Versuchsgruppen, wurde deutlich, dass die Anzahl der Osteoblasten in der Mutante an Tag 7 und 14 höher als im Wildtyp war. Die Abnahme der Osteoblastenzahlen erfolgte in diesen Tieren bereits bis zum Tag 21 und veränderte sich nachfolgend nicht mehr. Zwar hatten die nativen Knochen der $RAG1^{-/-}$ Tiere weniger Osteoblasten als die Wildtyp Tiere, unter inflammatorischen Bedingungen wie dem Prozess der Frakturheilung nahm die Zahl der

Osteoblasten, jedoch schneller zu als in den Wildtypen. Dies geschah möglicherweise durch die erhöhte Ausschüttung von TNF- α , die in RAG1^{-/-} Tieren nach einer Verletzung auftritt⁸⁸. Studien zeigten, dass TNF- α und IL1 sehr wichtige Zytokine für die Proliferation von Osteoblasten sind⁸⁹.

Verschiedene knock-out Tiermodelle mit B-Zell Defizienz, T-Zell Defizienz, Defizienz für CD40 oder CD40 Ligand zeigten eine verminderte Sekretion von OPG und somit einen Knochenmetabolismus, der vom anhaltenden Umbau betroffen war⁸⁰. Dieser Umbau der in Richtung Resorption verstärkt war, führte zu einem osteoporotischen Knochen. In T-Zell defizienten Mäusen konnte eine verringerte osteoblastäre Proliferation beobachtet werden⁸⁵, die auch in den in dieser Arbeit untersuchten nativen Knochen der RAG1^{-/-} Tiere zu finden war und sich in den verminderten Osteoblastenzahlen im Knochenmark der Tiere zeigte.

Die Osteoklastenzahlen blieben in den Mutanten auch während der Frakturheilung höher als in den Wildtypen. Der Wildtyp zeigte eine starke Zunahme der Osteoklasten bis zum Tag 14 und die Abnahme zum Tag 28 war nicht stark. In der Mutante hingegen verfünffachte sich die Osteoklastenzahl zwischen Tag 7 und 14 und ging zum Tag 28 ebenso schnell wieder zurück.

64% des gesamten im Körper vorkommenden OPG wird von aktivierten B-Lymphozyten produziert^{90,91}. OPG kann aber auch von Makrophagen und Osteoblasten sekretiert werden und über die Bindung an RANKL die Osteoklastogenese inhibieren⁹². Untersuchungen zeigten jedoch, dass in B Zell defizienten Tieren keine Kompensation des OPG-Mangels erfolgte^{90,91}. Da diese 64% OPG in der RAG1^{-/-} Maus fehlen, könnte die fehlende Hemmung der Osteoklastogenese eine Erklärung für den früheren und deutlich stärkeren Anstieg der Osteoklastenzahlen sein.

Osteoklasten sind sehr stark von Lymphozyten beeinflusst. Dies zeigten Studien mit knock-out Tieren für RANK, RANKL oder OPG. Knock-out Tiere für RANK^{-/-} und RANKL^{-/-} besaßen keine Osteoklasten und waren stark osteoporotisch^{93,94}, während OPG^{-/-} bei reduzierter Osteoklastenzahl osteopetrotisch waren⁹⁵. Dies lässt vermuten, dass in diesen Tieren gleichzeitig auch die Osteoblasten beeinflusst waren. Die höheren Osteoklastenzahlen zu einem früheren Zeitpunkt in der Frakturheilung in den RAG1^{-/-} Tieren, könnten Folge der schon in den nativen Tieren erhöhten Osteoklastenzahlen sein. Einen Einfluss darauf hat die

vermutlich verminderte Sekretion von OPG, da dieses nur von den Osteoblasten sekretiert wird, der Hauptproduzent, die B-Zelle, aber fehlt. Das „coupling“ zwischen Osteoblasten und Osteoklasten^{93,94} beziehungsweise zwischen Knochenneubildung und –resorption und die erhöhten Osteoklastenzahlen in den Mutanten könnten eine Erklärung für die vermehrte Anzahl von Osteoblasten während der Frakturheilung dieser Tiere sein.

4.3 Lymphozytendefizienz beeinflusst die enchondrale Ossifikation

Um einen Überblick über die verschiedenen Phasen der Heilung und die enchondrale Ossifikation zu erhalten, wurde die Movat Pentachrom Färbung als Übersichtsfärbung gewählt und histomorphometrisch ausgewertet. Dabei wurde besonderes Augenmerk auf das neue verknöcherte Gewebe und den Knorpel gelegt.

Knorpelphase

Bei der Färbung des Knorpels in beiden Versuchstiergruppen, lag der gravierendste Unterschied am Tag 7 nach Setzen der Fraktur vor. Beide Gruppen hatten zu diesem Zeitpunkt ihre maximale Knorpelmasse im Kallus erreicht, die im Wildtyp jedoch mit etwa 47% vom Gesamtkallus deutlich höher war als in den RAG1^{-/-} Tieren mit durchschnittlich 36%. Zu den darauf folgenden Zeitpunkten nahm die Knorpelmenge im Kallus beider Versuchsgruppen ab, der prozentuale Unterschied zwischen beiden blieb aber bestehen. An Tag 28 wiesen beide keinen Knorpel mehr auf. Dies ließ die Vermutung zu, dass die Knorpelphase in den RAG1^{-/-} Tieren zu einem früheren Zeitpunkt, wahrscheinlich um den Tag 5 herum, in der Heilungskaskade begann und folglich auch die Hypertrophie und die Apoptose in den Chondrozyten eher einsetzte als in den Wildtypen.

Die unterschiedlichen Reifephase der Chondrozyten an Tag 7 wurden mit Kollagen II für proliferierende und Kollagen X für hypertrophe Chondrozyten dargestellt. Hierbei war ersichtlich, dass im WT wesentlich größere Regionen Kollagen II-positiv waren, diese befanden sich über den gesamten Kallus verteilt. Im RAG1^{-/-} waren nur wenige Bereiche für Kollagen II positiv und lagen teilweise sehr weit von den Frakturrenden entfernt. Demnach besaß die WT-Gruppe mehr Kollagen II, welches regelmäßig im gesamten Kallus verteilt war, während in der RAG1^{-/-} Gruppe weniger proliferierende Chondrozyten zu finden waren. Ebenso bestanden einige dieser entfernt liegenden Bereiche aus hypertrophen Chondrozyten

und waren Kollagen X positiv. Im Wildtyp waren nur kleinste Bereiche leicht positiv für Kollagen X und befanden sich dichter an den Frakturenenden. Dies bestätigten die Ergebnisse der Movat Pentachrom Färbung und unterstrichen die im Vergleich zum WT vorangeschrittene Knorpelreifung in den RAG1^{-/-} Tieren. Diese frühere Proliferation und Reifung der Chondrozyten lässt sich möglicherweise auf die erhöhte Sekretion des inflammatorischen Zytokins TNF- α ⁹⁶ in der Mutante zurückführen. TNF- α sorgt so für die Apoptose der Chondrozyten und stimuliert gleichzeitig die Aktivität der Osteoblasten⁹⁷. TNF- α knock-out Tiere wiesen in Untersuchungen eine verzögerte Heilung auf, die mit einem verzögerten oder nicht stattfindenden Abbau des Knorpels eingingen⁹⁷. In einer Studie zur Inflammation konnte gezeigt werden, dass mit zunehmender Infiltration von Neutrophilen, die Chondrogenese beeinflusst wurde⁹⁸. Es ist durch aus vorstellbar, dass durch das Fehlen der adaptiven Immunantwort die inflammatorische Reaktion durch die Zellen des angeborenen Immunsystems verstärkt wurde und es zu einer verstärkten Infiltration von Neutrophilen in den Kallus der Mutante kam. Dies könnte zur unterschiedlichen Reife des Knorpels an den Tagen 7 und 14 zwischen den Versuchsgruppen beigetragen haben.

Kollagen II wurde im WT erst an Tag 14 hochreguliert, während es in der Mutante eine sich kaum verändernde Regulation dieses Gens gab, sondern es generell eine höhere Expression aufwies und somit auf eine frühere Knorpelentstehung und Differenzierung hinwies. Ein weiteres unterschiedlich reguliertes Gen war Kollagen XII, welches von Osteoblasten aufgrund mechanischen Stresses gebildet wird und die Differenzierung von Osteoblasten und die Knochenbildung anzeigt⁹⁹. Dieses wurde im WT zunächst in seiner Expression inhibiert, während die Expression im RAG1^{-/-} stimuliert wurde. Diese unterschiedlichen Expressionen weisen darauf hin, dass die Knochenbildung in den RAG1^{-/-} Tieren früher initiiert wurde.

BMP1, das Protein, welches Prokollagene modifiziert und die Bildung von Knorpel und Knochen initiiert, zeigte in der Mutante keine deutliche Regulation seiner Expression. In den WT Tieren hingegen wurde dieses Gen zunächst in seiner Expression gedrosselt und erst nach 7 Tagen hochreguliert. Dies kann als weiteres Zeichen einer vorliegenden Veränderung in der Knorpelphase der RAG1^{-/-} Versuchsgruppe gewertet werden. BMP1 wurde in den Mutanten scheinbar zu früh exprimiert und so die Bildung von Knochen und Knorpel stimuliert, während im WT ein zeitlich regulierter Prozess und somit eine später stattfindende Bildung von Knochen und Knorpel begünstigt wurde.

Ossifikation

Hinsichtlich der Verknöcherung traten nicht so deutliche Unterschiede zwischen den beiden Versuchsgruppen auf. Die histomorphometrische Auswertung ergab lediglich an Tag 7 einen deutlichen Unterschied zwischen beiden Gruppen. Dabei nahm der bereits verknöcherte Kallusbereich in den WT Tieren im Median 4,5 % ein und in den RAG1^{-/-} Tieren 9,4%. Der Unterschied setzte sich in den folgenden Untersuchungszeitpunkten nicht fort, sondern wurde geringer. Jedoch erfolgte der beginnende Knochenabbau für das Remodeling im Kallus von Tag 21 zu Tag 28 in der Mutante etwas schneller.

Auch die Expression von Kollagen I wurde im Kallus untersucht. Dieses Kollagen wird typischerweise von Osteoblasten in den zu mineralisierenden Bereichen exprimiert. Im Gegensatz zum Wildtyp, in dem Kollagen I den Rand des Kallus umgab und an den Frakturenden auftrat, wies die RAG1^{-/-} Gruppe nur wenig Kollagen I auf, welches sich fast ausschließlich auf die Kortizes beschränkte. Dies ist ein deutliches Indiz dafür, dass in dieser Versuchsgruppe eine Veränderung in der Knorpelphase vorlag und daraus folgend scheinbar auch eine Veränderung der Ossifikation. Auch die Kollagene II und X waren nicht wie in den Wildtypen an den Frakturrenden zu finden, sondern spaltfern.

Die histologischen Befunde wurden durch die Microarray Analyse bestätigt. Hier zeigten sich im Gen-Cluster 2 und 3 signifikant unterschiedliche Regulationen der Genexpressionen für die einzelnen Kollagene. Es zeigte sich, dass Kollagen I bereits an Tag 3 in den Mutanten hochreguliert wurde, wohingegen dies in den WT Tieren erst zum Tag 14 geschah. Kollagen I ist dabei für die Bildung der stabilen Blutgefäßwände¹⁰⁰ und die Knochenbildung der enchondralen Ossifikation verantwortlich¹⁰¹, wobei es das Grundgerüst bildet in das sich Proteoglykane und andere Proteine einlagern.

Die *in vivo* Fluorochrommarkierung bestätigte diese Befunde und zeigte eine stärkere Einlagerung der Farbstoffe in der RAG1^{-/-} Versuchstiergruppe. Der Abbau der verwendeten Farbstoffe erfolgte früher im Heilungsverlauf. Die injizierten Fluorochrome banden dabei an das in den Knochen eingelagerte Kalzium. Dies erlaubte einen indirekten Nachweis der Knochenbildung. Beim Knochenabbau wurde das Kalzium mit dem daran gebundenen Fluorochrom wieder aus der Knochenmatrix herausgelöst und konnte kein Signal geben. Es

wurde in beiden Untersuchungen bestätigt, dass die Ossifikation des Kallus im WT langsamer ablief und auch das Remodeling zeitverzögert einsetzte. Möglicherweise war die frühere Geflechtknochenbildung und das früher im Heilungsverlauf einsetzende Remodelling aber nur die Folge der zeitlich eher erfolgten Verknöcherung des Knorpels und dessen Abbau in den RAG1^{-/-} Tieren. Eine weitere mögliche Erklärung für diese Ergebnisse könnte die Sekretion von Mediatoren wie TNF- α , IL1 oder IL6 durch aktivierte Zellen des angeborenen Immunsystems sein, die in sehr hohen Konzentrationen inhibitorische Wirkungen auf die Zellen des Knochenmetabolismus haben können¹⁰². Auch Lymphozyten sind in der Lage diese Mediatoren zu sekretieren und deren Konzentration weiter zu erhöhen. Die schnellere Verknöcherung im Kallus der Mutanten könnte folglich durch veränderte Konzentrationen dieser Mediatoren herbeigeführt worden sein, da sie in dieser Versuchsgruppe nicht von Lymphozyten gebildet werden konnten. Andere Studien zeigten, dass die Depletion von CD8 positiven T-Lymphozyten die Wundheilung beschleunigte¹⁰³. Die Depletion von $\gamma\delta$ - T- Lymphozyten hatte einen positiven Einfluss auf die Frakturheilung. Es konnte ebenso wie in den hier durchgeführten Experimenten eine frühere mechanische Kompetenz, eine verminderte Knorpelmenge und eine verstärkte Ossifikation beobachtet werden¹⁰⁴. Die Arbeitsgruppe um Toraldo fand heraus, dass scheinbar alle schädlichen auf den Knochen wirkenden Effekte nach einer Fraktur von T-Lymphozyten ausgelöst werden⁷³.

Zunächst deutete in diesen Untersuchungen und in den biomechanischen Testungen aus der Doktorarbeit von Jan Frisch (2011), in der er eine frühere mechanische Kompetenz und Stabilität in den Knochen der RAG1^{-/-} Tiere beschrieb, alles darauf hin, dass die Frakturheilung in den RAG1^{-/-} Tieren schneller als in den WT Tieren war und früher die nötige Stabilität erreicht wurde. Dabei darf jedoch die veränderte Knorpelphase nicht außer Acht gelassen werden. Um die Differenzierung mesenchymaler Stromazellen und die Fähigkeit zur Ablagerung extrazellulärer Matrix durch daraus differenzierte Osteoblasten zu beurteilen, wurden erste Voruntersuchungen *in vitro* durchgeführt. Die daraus resultierenden Ergebnisse könnten einen Hinweis auf den *in vivo* ablaufenden Prozess der Ablagerung der extrazellulären Matrix geben.

In den *in vitro* Untersuchungen zeigten die in die osteogene Richtung differenzierten mesenchymalen Stromazellen des WTs eine regelmäßige Ablagerung über das gesamte Well verteilt, während es bei den RAG1^{-/-} Tieren keine regelmäßige Verteilung gab, sondern diese

an einigen Stellen stark hervortrat und an anderen nicht existent war. Demnach schien bei der Frakturheilung in den $RAG1^{-/-}$ Tieren nicht nur eine Veränderung der Knorpelphase, sondern daraus folgend auch eine Veränderung der Verknöcherung vorzuliegen. Ob diese Veränderung durch das Fehlen von $RAG1^{-/-}$ in den mesenchymalen Stromazellen bereits die Differenzierung zu Chondrozyten oder Osteoblasten¹⁰⁵ beeinflusste, konnte mit dieser Untersuchung nicht getestet werden. In dieser Arbeit wurde die chondrogene Differenzierung der mesenchymalen Stromazellen nicht untersucht, die aus den bisherigen Voruntersuchungen erhaltenen Daten lassen aber auch hier Unterschiede zwischen beiden Versuchsgruppen vermuten. Möglicherweise könnten die verschiedenen Untersuchungsergebnisse auch darauf zurückgeführt werden, dass die mesenchymalen Stromazellen der Wildtyp Tiere im Tier bereits Kontakt zu Lymphozyten hatten und ihr Verhalten daher anders war, als das der mesenchymalen Stromazellen der $RAG1^{-/-}$ Tiere, die nie Kontakt zu Lymphozyten hatten. Dieser Fakt sollte in weiteren Untersuchungen betrachtet werden. Da mesenchymale Stromazellen in der Lage sind eine proinflammatorische Antwort von dendritischen Zellen in eine anti-inflammatorische umzukehren¹⁰⁶ und nach einer Fraktur mit den natürlichen Killerzellen interagieren, um deren zytotoxische Wirkung zu vermindern¹⁰⁷, sollten auch hier Untersuchungen bezüglich etwaigen Unterschieden vorgenommen werden. Eine mögliche Veränderung dieser Funktionen der MSCs der $RAG1^{-/-}$ Tiere könnte weitreichende Folgen im Prozess der Frakturheilung verursachen. Des Weiteren können sie die Proliferation und Aktivität von B- und T-Lymphozyten hemmen^{108,109}.

4.4 Inflammation und Frakturheilung

Immunhistologische Untersuchungen der Schnitte beider Versuchsgruppen wurden vorgenommen, um die zu den Untersuchungszeitpunkten im Kallus befindlichen Immun- und Knochenzellen gleichzeitig zu detektieren. Dies ermöglichte eine Aussage über die Infiltration am Heilungsprozess beteiligter Zellen und ihrer möglichen Funktion.

Die Kaskade der Frakturheilung beginnt immer mit einer etwa eine Woche andauernden inflammatorischen Reaktion, an der sowohl Zellen des angeborenen als auch des adaptiven Immunsystems beteiligt sind. Die Inflammation spielt eine wichtige Rolle für die Initiation der Knochenregeneration^{110,111}. Das Entstehen einer Fraktur stimuliert dabei die Sekretion inflammatorischer Zytokine wie IL1, IL6, IL18 und $TNF-\alpha$, die ihre maximale Expression in der Maus nach 24 Stunden erreichen⁹⁷. Diese werden zunächst von Makrophagen und

Neutrophilen sekretiert. IL1 ist dabei zeit- und dosisabhängig in der Lage, die Proliferation von Osteoblasten zu stimulieren. Sowohl IL1 als auch TNF- β inhibieren in großen Mengen zwar die Aktivität der Osteoblasten, jedoch nicht deren Proliferation¹¹². TNF- α ist ein weiteres Zytokin, welches in geringer Menge die Proliferation der Osteoblasten stimuliert, in hohen Konzentrationen jedoch inhibiert¹¹². Es sorgt gemeinsam mit IL6, TGF- β und verschiedenen BMPs für die Rekrutierung weiterer inflammatorischer Zellen und unterstützt die Angiogenese und die Differenzierung der mesenchymalen Stammzellen^{74,113}. Durch das Fehlen der Lymphozyten in den RAG1^{-/-} Tieren kommt es wahrscheinlich zu einer verminderten Synthese von TNF- α und daher zu einer Stimulation der Osteoblasten. Dies zeigte sich in den erhöhten Osteoblastenzahlen in der Osteokalzin-Färbung. In den Wildtypen dagegen kam es zu einer unter Frakturbedingungen normalen Ausschüttung von TNF- α , die vermutlich die Proliferation der Osteoblasten inhibierte. Auch andere inflammatorische Zytokine von Lymphozyten werden wahrscheinlich in den RAG1^{-/-} Tieren fehlen oder durch andere Immunzellen in veränderten Konzentrationen gebildet. Diese veränderten Konzentrationen von Zytokinen und Chemokinen zwischen den Wildtypen und den Mutanten haben wahrscheinlich einen Einfluss auf den Heilungsprozess.

Gleichzeitig gehen Osteoblasten im Frakturgebiet nach einer Knochenverletzung in Apoptose. Die dadurch entstehenden Zelltrümmer werden von intakten Osteoblasten aufgenommen. Durch eine Erhöhung von IL1 und TGF- β geschieht dies früher¹¹⁴. Auch aktivierte T-Lymphozyten produzieren aufgrund erhöhter IL1- β und TNF- α Konzentrationen in Kombination mit IL17 mehr RANKL und TNF- α . Wohingegen IL4, IL13, IFN- γ und TGF- β der T-Lymphozyten OPG induzieren und folglich die Osteoklastogenese supprimieren⁹². Die veränderten Konzentrationen von Zytokinen und Chemokinen, aufgrund der fehlenden Lymphozyten, zwischen den Wildtypen und den Mutanten haben daher einen Einfluss auf den Heilungsprozess. In einer Studie zur post-menopausalen Osteoporose wurde der schädigende Effekt von T-Zellen über die Sekretion von TNF- α bestätigt. Dabei wurde gezeigt, dass in der Abwesenheit von Östrogen mehr TNF- α von T-Lymphozyten produziert wird und diese erhöhte Konzentration direkt Osteoklasten stimuliert und ihre Antwort auf RANKL noch erhöht^{91,115}. Vierundzwanzig bis 48 Stunden nach der Fraktur dominieren Makrophagen und T- Helferzellen im Frakturspalt¹¹⁶. Aber auch B-Lymphozyten scheinen eine wichtige Rolle zu spielen, ihre Zellzahl ist 4 Stunden nach der Fraktur im Hämatom erhöht¹¹⁷ und sie sind ein wichtiger Regulator der Knochenresorption. Ihr Fehlen führt zu einem veränderten

Zytokinmuster¹¹⁸. Auch in den vorliegenden Untersuchungen wurden erhöhte Osteoklastenzahlen sowohl in den nativen Knochen, als auch in den frakturierten Knochen der RAG1^{-/-} Tiere gefunden, die den Einfluss der B-Lymphozyten auf die Resorption bestätigen.

In den Tieren des Wildtyps kam es zwischen Tag 7 und 14 zu einer Infiltration des Kallus mit Lymphozyten. Die B-Lymphozyten bildeten den Hauptteil der Lymphozyten-Populationen und lagen in großen Verbänden vor, während die T-Lymphozyten nicht sehr häufig vertreten und zwischen den B-Zell-Verbänden zu finden waren. Zu diesen Untersuchungszeitpunkten traten beide Lymphozyten-Populationen in Bereichen von Geflechtknochen auf, nicht jedoch in Bereichen des Knorpels. Bei Betrachtung der Osteoblasten und Osteoklasten im Kallus der Tiere wurde deutlich, dass diese Knochenzellen entweder eine große Nähe zu den B-Lymphozyten aufwiesen oder wie erwartet an den Rändern des Geflechtknochens zu finden waren. In den RAG1^{-/-} Tieren konnten in den histologischen Schnitten keine Lymphozyten detektiert werden, obwohl in der FACS Analyse des nativen Knochens geringe Mengen B220 positiver und CD3 positiver Zellen gefunden wurden. Wie bereits in der Osteoklastenspezifischen TRAP Färbung konnte auch hier eine größere Anzahl Osteoklasten im Kallus der Mutante gefunden werden. Die Veränderungen im Heilungsverlauf in den RAG1^{-/-} Tieren, speziell im Aufbau von Knorpel und Knochen, sind demnach wahrscheinlich auf die Abwesenheit der Lymphozyten und der von ihnen produzierten inflammatorischen und anti-inflammatorischen Zytokine, sowie die veränderten Osteoblasten- und Osteoklastenzahlen zurückzuführen.

Drei bis sieben Tage nach der Verletzung und in der Phase des Remodeling sind die Osteoblasten und Chondrozyten die Hauptproduzenten der inflammatorischen Zytokine⁷⁶. Ein Fehlen dieser inflammatorischen Signale führt häufig zur Entstehung einer „non-union“. Untersuchungen in Tiermodellen mit einer solchen „non-union“ zeigten reduzierte Expressionsmengen von BMP2, 4, 7, TGF- β und TNF- α ¹¹⁹. Experimente zeigten, dass T-Helferzellen der dominante Zelltyp in „non-unions“ waren¹²⁰. Sie scheinen die Knochenzerstörung in inflammatorisch vermittelten Krankheiten, wie Rheumatoider Arthritis und Peridontitis, zu bedingen^{71,94,121}. In diesen Fällen gehören die CD4 Zellen zu den IL17 produzierenden Zellen^{122,123}. In den immunhistologischen Färbungen zeigte sich, dass die CD4 positiven Zellen stärker vertreten waren, als die CD8 positiven T-Lymphozyten. Daher wäre es denkbar, dass die CD4 positiven Lymphozyten für die zeitliche Abfolge der

Heilungsprozesse unter inflammatorischen Bedingungen verantwortlich sind. Da die inflammatorische Reaktion im Frakturheilungsprozess aber abnimmt und schließlich ganz abklingt, kommt es nicht zu einer dauerhaften Schädigung durch die T-Helferzellen. In den RAG1^{-/-} Tieren gab es diese T-Helferzellen nicht, möglicherweise kam es dadurch zur früheren Reifung und Verknöcherung der Chondrozyten und folglich früher zur Geflecht-knochenbildung und Überbrückung des Frakturkallus. Eine chronische Überproduktion von BMP2, 4, 7, TGF- β , TNF- α und IL17 führte zu einer Zerstörung des Knochens, die systemische Gabe von TNF- α z.B. zerstörte das Knochengewebe und die Tiere entwickelten die Symptome einer Rheumatoiden Arthritis¹²⁴. Viele Erkrankungen, die mit einer starken Inflammation einhergehen, wie die Peridontitis oder Rheumatoide Arthritis, werden daher mit anti-inflammatorischen Medikamenten behandelt. Immer mehr Studien weisen aber darauf hin, dass die Gabe anti-inflammatorischer Medikamente hauptsächlich negative Effekte hat^{125,126}.

Eine Inflammation ist für den Initiation der Frakturheilungskaskade essentiell, eine Hyperinflammation aber schädlich. Studien zeigten, dass die Gabe von Medikamenten, die die Inflammation stimulieren ebenfalls zu einem schlechteren Heilungsverlauf führten. Beispielsweise sorgte die Gabe von aminiertem Glycan für die Entstehung eines unreifen hypertrophen Kallus¹²⁷ und ein zusätzliches Muskeltrauma für eine Hyperinflammation¹²⁸. Auch die Gabe von LPS (Lipopolysaccharid) resultierte in einem hypertrophen Kallus mit geringen mechanischen Eigenschaften¹²⁹. Betrachtet man diese Studien und das Ergebniss, dass sowohl anti-inflammatorische als auch inflammatorische Medikamente einen Einfluss auf die Frakturheilung haben, wird nochmals deutlich das in den RAG1^{-/-} Tieren mit verkürzter und eventuell abgeschwächter Inflammation, bedingt durch die Abwesenheit der Lymphozyten, Veränderungen im Heilungsprozess vorliegen.

Wahrscheinlich stimulieren die zuerst einwandernden neutrophilen Zellen die Chondrogenese, während sie die Osteogenese inhibieren⁷⁵, denn eine Studie bewies, dass es bei einer Reduktion der neutrophilen Zellen durch ein anti-neutrophilen Serum in Ratten zu einer beschleunigten Heilung kam¹³⁰. Diese Tiere wiesen weniger Knorpel und Kollagen II auf und zeigten gleichzeitig erhöhte Level von Osteokalzin¹³⁰.

Eine mögliche Erklärung für die frühere Verknöcherung und knöcherne Überbrückung des Kallus in den $RAG1^{-/-}$ Tieren, könnte auch das Fehlen der $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten sein. Colburn et al. zeigten, dass diese Zellen wichtig für die Rekrutierung inflammatorischer Zellen an den Ort des Geschehens waren¹⁰⁴. Bei Abwesenheit der $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten kam es zu einer um das Sechsfache verringerten zellulären Einwanderung in den Frakturspalt¹³¹. Nach einer systemischen Inflammation ist diese T-Zell-Subpopulation verantwortlich für die Neutrophilen-vermittelte Gewebeerstörung, in der zelluläre Überreste und apoptotische und beschädigte Zellen aus dem Frakturspalt entfernt werden¹³².

4.5 Die Frakturheilung in $JHT^{-/-}$ und $\beta\delta^{-/-}$ Tieren an Tag 7

Bei der Untersuchung der Frakturheilung in WT und Lymphozyten-defizienten Mäusen stellte sich heraus, dass die Frakturheilung in den Mutanten scheinbar schneller erfolgte und die Stabilität des Kallus frühzeitiger gegeben war. Jedoch zeigten die histologischen Ergebnisse, dass es in diesen Tieren zu einer Veränderung der enchondralen Ossifikation während der Knorpelphase kam. Um die Lymphozyten-Population näher einzuschränken, die für diese Resultate verantwortlich war, wurden zwei weitere Versuchsgruppen an Tag 7 nach der Fraktur analysiert. Dabei handelte es sich zum einen um die $\beta\delta^{-/-}$ Maus¹³³, die keine T- aber dafür B-Lymphozyten ausbildete und die $JHT^{-/-}$ Maus¹³⁴, die nur T-Lymphozyten besaß.

Die histologische und histomorphometrische Untersuchung der $\beta\delta^{-/-}$ Tiere ergab einen in diesen Tieren hauptsächlich aus hypertrophen Chondrozyten bestehenden Kallus, der eine beginnende Verknöcherung aufwies. Die histomorphometrische Auswertung der Movat Pentachrom gefärbten Schnitte zeigte einen höheren Anteil verknöcherten Gewebes in den Mutanten. Der Anteil verknöcherten Gewebes war dem der $RAG1^{-/-}$ Tiere sehr ähnlich und lag über der Menge verknöcherten Gewebes in den WT Tieren. Auch bei der Auswertung des Knorpelbereichs ergaben sich ähnliche Ergebnisse. Auch hier glich der prozentuale Anteil an Knorpel im Kallus eher den $RAG1^{-/-}$ Tieren als dem der Wildtypen. Da keine weiteren Zeitpunkte in der Heilungskaskade dieser Versuchstiergruppe untersucht wurden, kann keine eindeutige Aussage über den Ausgang der Heilung gemacht werden. Da sich aber $RAG1^{-/-}$ und $\beta\delta^{-/-}$ an Tag 7 nach der Fraktur sehr stark ähneln, liegt die Vermutung nahe, dass auch das Heilungsergebnis beider Versuchsgruppen ähnlich ausgefallen wäre. Demnach wären die B-Lymphozyten allein nicht in der Lage, einen Frakturheilungsprozess zu initiieren, der durch

eine Ablagerung von Kollagen I am Rand des Kallus und eine geordnete Synthese der Kollagene II und X charakterisiert ist.

Experimente mit T-Zell Defizienten Nacktmäusen zeigen, dass diese nach der Geburt und bis etwa vier Wochen danach eine höhere mineralisierte Knochendichte (BMD) aufweisen, die anschließend abnimmt^{73,135}. Auch wenn die BMD in den hier untersuchten RAG1^{-/-} Tieren noch keine signifikanten Veränderungen zum Wildtyp zeigte, bewiesen die immunhistologischen Untersuchungen der nativen Knochen beider Versuchstiergruppen einer erhöhte Osteoklasten- und eine verminderte Osteoblastenzahl in der Mutante. Daraus lässt sich schließen, dass die Abwesenheit von T-Lymphozyten einen negativen Einfluss auf die Knochendichte hat und demnach auch eine Veränderung in der Knochenheilung denkbar wäre. Die B-Lymphozyten des Wildtyps sekretieren etwa dreimal mehr OPG als die T-Zell defizienter Tiere. Eine Veränderung der RANKL Expression konnte jedoch nicht beobachtet werden⁶⁹. Die CD8 positiven T-Lymphozyten scheinen aber eine protektive Wirkung auf den Knochenmetabolismus zu haben. Es wurde gezeigt, dass CD8 positive Lymphozyten ein Inhibitor der Osteoklastogenese^{72,136,137} sind und nach einer Stimulation mit Antikörpern gegen CD3 und CD28 mit einer verzögerten RANKL Expression reagieren, während CD4 positive Zellen sofort große Mengen RANKL synthetisieren¹³⁸. Wahrscheinlich wird aber die protektive Funktion der Knochenmarkslymphozyten auf einem anderen Weg erreicht, als dem, der mit inflammatorischen Knochenerkrankungen assoziiert ist¹³⁹. Studien zeigen aber auch, dass T-Lymphozyten in nicht-lymphatischen Geweben durch natürliche Killerzellen (NK) ersetzt werden können. Dies geschieht besonders in Lunge und Leber, wobei die Zahl der NK-Zellen mit dem T-Zell Verlust korreliert. Eine Untersuchung der NK Zellzahlen, zeigte im Knochenmark jedoch keine veränderten Zellzahlen verglichen mit dem Wildtyp. Beide Zelltypen, T-Lymphozyten und natürliche Killerzellen teilen viele Effektorfunktionen, sodass es sich hierbei eventuell um einen kompensatorischen Mechanismus handelt⁵⁴. Studien zur Knochendichte bei HIV Patienten zeigen, dass auch diese bereits vor Therapiebeginn eine verringerte Knochendichte besitzen, die unter der Therapie noch weiter abnimmt. Die geringe BMD entsteht aufgrund eines Ungleichgewichts zwischen RANKL und OPG, sodass eine massive Resorption eintritt. B-Lymphozyten sekretieren unter diesen Bedingungen statt des Osteoklastogenese-inhibierenden OPGs das Knochenabbau-stimulierende RANKL⁸⁰. Diese Resultate lassen auf die essentielle Rolle der B-Lymphozyten im Knochenmetabolismus

schließen. Daher wurden die JHT^{-/-} Tiere und somit das Fehlen der B-Lymphozyten in der Frakturheilung untersucht.

Die Untersuchungen der B-Zell defizienten Tiere ergab einen sehr ähnlichen Heilungsstatus wie beim untersuchten Wildtyp. Der Kallus der JHT^{-/-} Tiere bestand zu etwa gleichen Teilen aus proliferierenden sowie hypertrophen Chondrozyten mit einer leichten Verknöcherung. Die histomorphometrische Auswertung ergab signifikant mehr knöchernes Gewebe in den RAG1^{-/-} Tieren und den $\beta\delta$ ^{-/-} Tieren verglichen mit WT und JHT^{-/-}. WT und JHT^{-/-} glichen sich auch im prozentualen Anteil des Knorpels am Gesamtkallus. Dieser lag über dem der anderen beiden Mutanten. Daraus kann geschlossen werden, dass das Fehlen von B-Lymphozyten nicht oder kaum zu einer veränderten Frakturheilung führt und sehr wahrscheinlich die T-Lymphozyten zu einem koordiniert ablaufenden und zeitlich korrekten Heilungsverlauf beitragen.

B-Zell defiziente Mäuse erreichen erst nach etwa 16 Wochen ihre höchste Knochendichte¹⁴⁰, die sich anschließend wieder verringert⁶⁹. Im Knochenmark der Tiere befinden sich B-Lymphozyten aller Reife- und Entwicklungsstadien. Sie produzieren nach ihrer Aktivierung und der CD40 CD40L Interaktion durch T-Lymphozyten OPG⁷³. Untersuchungen von μ MT Mäusen, die ebenfalls keine reifen B-Lymphozyten besitzen, haben gezeigt, dass es in diesen Tieren zu einer Verdünnung der Kortizes und zu einer Abnahme der trabekulären Strukturen kommt¹⁴¹. Ebenso exprimierten diese Tiere 40% weniger OPG als die Wildtypiere. B-Lymphozyten scheinen als ein Regulator der mineralisierten Knochendichte zu sein, zum Einen direkt über OPG Sekretion zum Anderen indirekt über die Regulation seiner Produktion. Ein adoptiver Transfer von B-Zellen in die μ MT Mäuse resultierte im Aufbau einer normalen Knochendichte⁷³. In den hier untersuchten Tieren konnten wie bereits erwähnt keine deutlichen Unterschiede in der Knochendichte zwischen den Versuchsgruppen beobachtet werden, jedoch bereits veränderte Osteoblasten- und Osteoklastenzahlen. Diese deuteten auf eine beginnende Verringerung der Knochendichte hin.

Ein weiterer Beweis für die Wichtigkeit der Lymphozyten in der frühen Phase der Osteoinduktion sind Studien zur Fibrodysplasia ossificans progressiva. Hier zeigt sich, dass es bei einer Überexpression von BMP4 durch Lymphozyten zu einem Ausbleiben der ektopen Osteogenese kommt¹⁴² und frühe Läsionen durch die Infiltration von B- und T-Lymphozyten

charakterisiert werden¹⁴³. Eine Depletion der B-Lymphozyten vermindert die humorale Immunantwort (Th2) und triggert sie in Richtung einer inflammatorischen und zell-vermittelten Antwort (Th1)¹⁴⁴.

Im Allgemeinen befinden sich Antigene, ob selbst oder fremd, immer im Körper¹⁴⁵⁻¹⁴⁷. Das Immunsystem ist daher immer dabei, den Körper zu überwachen und auch im gesunden Patienten finden Interaktionen zwischen T- und B-Lymphozyten statt. Diese geringe vorhandene Immunantwort steht aber im Kontrast zur T- Zelleaktivierung bei einer Inflammation⁹⁴, wie sie bei einer Fraktur entsteht. In diesen Situationen kommt es zu einer starken Expansion und Aktivierung der RANKL exprimierenden T-Lymphozyten. Durch TNF- α und andere Zytokine wird die RANKL Produktion nochmals gesteigert⁶⁹. In manchen pathologischen Situationen können B-Lymphozyten über die Interaktion von CD40 und CD40L zur Produktion von OPG angeregt werden. Dies sind Situationen wie das Auftreten von multiplen Myelomen¹⁴⁸ oder einer Östrogendefizienz¹⁴⁹.

In der Einleitung dieser Dissertation wurden die 4 Phasen der Frakturheilung beschrieben. Zur Rekapitulation der bereits bekannten Abläufe ist sie in Abb. 68 nochmals dargestellt. Zusammenfassend kommt es in der ersten Phase zur Bildung eines Frakturhämatoms und einer inflammatorischen Reaktion (Abb. 68 A). Anschließend setzt die Proliferation der Chondrozyten ein und es entsteht ein knorpeliger Kallus. Zum Ende dieser Phase setzt die enchondrale Ossifikation ein. Nachdem der Knorpel abgebaut ist und der Kallus aus Geflechtknochen besteht, setzt die letzte und längste Phase der Frakturheilung ein, die Remodeling Phase, in der der Geflechtknochen zu Lamellenknochen umgebaut und die Ausgangsstruktur des Knochens wieder hergestellt wird.

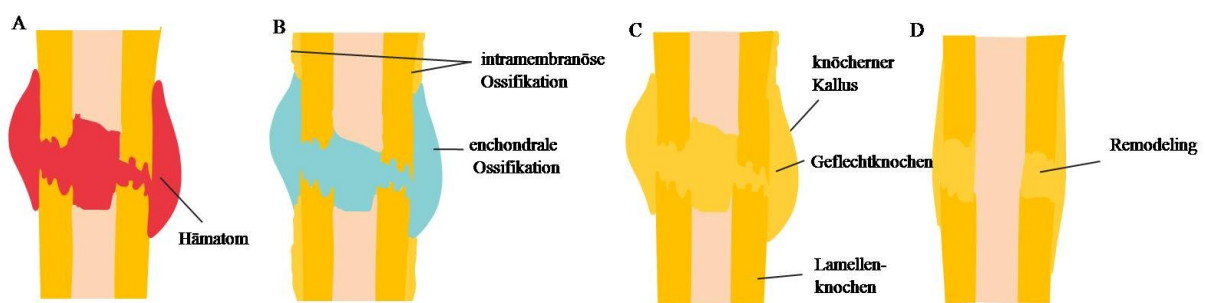


Abb. 68: Darstellung der 4 Phasen der Frakturheilung. A) Inflammation und Bildung des Hämatoms. B) Bildung des knorpeligen Kallus und Beginn der enchondralen Ossifikation. C) Phase des knöchernen Kallus. D) Remodeling Phase

Über die Beteiligung der Immunzellen an den unterschiedlichen Heilungsphasen war kaum etwas bekannt. Mit Hilfe dieser Arbeit konnte die Einwanderung und Verteilung von Immunzellen während des Heilungsprozesses analysiert werden. Diese Einwanderung und Verteilung der Lymphozyten ist in Abb. 69 dargestellt. Dabei beschreiben die Buchstaben vor den jeweiligen Abbildungen der Knochen, die Einordnung in die bisher bekannte Abfolge.

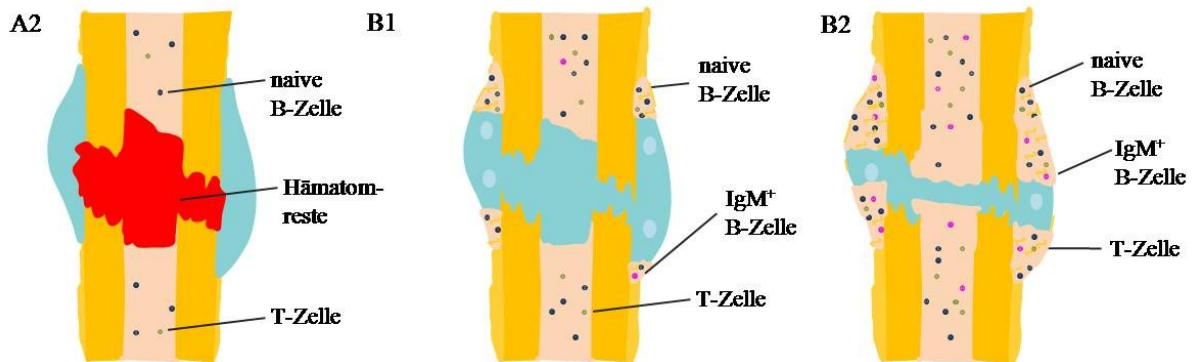


Abb. 69: Zu Beginn der Frakturheilung (A2) befinden sich die Lymphozyten ausschließlich im Knochenmark und nehmen in ihrer Anzahl in Richtung Knie bzw. Femurkopf zu. Während der Heilung kommt es zu einer Reifung der B-Lymphozyten (B1) von naiven IgM und IgD positiven Zellen zu IgM oder IgG positiven B-Lymphozyten. Die Lymphozytenzahl wird im Verlauf größer und sie treten in Bereichen der intramembranösen Ossifikation auf. Je kleiner der Bereich der Chondrozyten, desto größer wird die Zahl der Lymphozyten (B2).

Zu Beginn der Heilung gelangen Immunzellen durch das Entstehen eines Hämatoms in den Frakturspalt. Das Hämatom wird im Heilungsverlauf zunehmend kleiner und ein knorpeliger Kallus bildet sich heraus. In diesem Kallus befinden sich keine Immunzellen. Diese sind ausschließlich im Knochenmark zu finden und nehmen in ihrer Zahl zu den Knochenenden hin zu (Abb. 69 A2). Noch sind die B-Lymphozyten naiv. Mit zunehmendem Voranschreiten der Heilung wandern die Immunzellen in die Bereiche des neugebildeten Knochens ein und vollziehen einen Klassenwechsel zu IgM oder IgG positiven B-Lymphozyten. Es befinden sich nur noch vereinzelt naive B-Zellen im Kallus. Mit der Abnahme des Knorpelanteils im Kallus, nimmt die Menge der Lymphozyten zu. Im Knorpelgewebe selbst treten sie jedoch zu keiner Zeit auf. Auch im Knochenmark werden die Immunzellen während der Frakturheilung mehr und befinden sich immer öfter in Nähe des Frakturspalts.

In den RAG1^{-/-} Tieren waren keine Lymphozyten im Knochenmark und Kallus zu finden. Daher konnten sie und ihre Mediatoren keinen Einfluss auf den Heilungsverlauf nehmen. Schon die nativen Knochen der RAG1^{-/-}, B- und T-Zell defizienten Tiere werden nach einigen Lebenswochen der Tiere osteoporotisch und weisen ein Ungleichgewicht zwischen Osteo-

blasten und Osteoklasten auf. Dieses Ungleichgewicht könnte sich im Prozess der Frakturheilung potenzieren. Der größte Unterschied zeigte sich jedoch in der Knorpelphase zwischen beiden Versuchstiergruppen. In den $RAG1^{-/-}$ Tieren wurde Kollagen X an Stellen im Kallus gefunden, wo eigentlich eine intramembranöse Ossifikation stattfindet. Auch Kollagen II wird hauptsächlich spaltfern synthetisiert. Die Knochenbildung setzt in den Mutanten im Heilungsverlauf zeitiger ein. Zum Ende der Frakturheilung weisen beide Versuchstiergruppen annähernd gleiche Mengen Knochen auf und der Knorpel ist komplett abgebaut. Die deutlichsten Unterschiede zeigen sich somit im Übergang des knorpeligen zum knöchernen Kallus. Bei den Untersuchungen der Mutanten für nur B- oder nur T-Lymphozyten zeigt sich, dass die Heilung in den $JHT^{-/-}$ Tieren, ohne B-Lymphozyten, aber mit T-Lymphozyten, der Heilung in den Wildtypen gleicht.

Das Fehlen der T-Lymphozyten scheint daher einen größeren Einfluss zu haben als das Fehlen der B-Lymphozyten. Scheinbar exprimieren B-Lymphozyten in der Abwesenheit von T-Lymphozyten eher RANKL als das die Osteoklastogenese inhibierende OPG und sorgen somit für einen schnellen Knochenabbau und damit einhergehend eine hohe osteoblastäre Aktivität. Fehlen hingegen T-Lymphozyten, könnte es zu einer verminderten Inflammation kommen. Somit würden die B-Lymphozyten eher das die Osteoklastogenese inhibierende OPG produzieren als das Knochenabbau fördernde RANKL.

4.6 Ausblick

Diese Arbeit zeigt, dass das Fehlen der Lymphozyten einen Effekt auf die Knochenheilung besitzt. Das Fehlen von B- und T-Lymphozyten führt zwar zu einer schnelleren mechanischen Stabilität der Fraktur, jedoch sind die Knorpelphase und die Ossifikation beeinflusst. Es scheint so, als beginnt die Knochenbildung im $RAG1^{-/-}$ Tier eher und die Knorpelphase wäre dadurch verkürzt. Dies zeigt sich an der kurzen Zeit, in der die Chondrozyten der Mutanten Kollagen II synthetisieren, dieses aber sehr weit vom Spalt entfernt produziert wird. Auch die Expression von Kollagen I scheint gestört und damit eine Anlagerung von Knochen erschwert. Die zellbiologischen Untersuchungen zeigen, dass die Ossifikation in den $RAG1^{-/-}$ Tieren gestört ist. Bei den Untersuchungen der einzelnen Lymphozyten knock out Tiere scheinen die T-Lymphozyten der Schlüssel für die funktionell und zeitlich richtig ablaufende Heilungskaskade zu sein. Daher sollte ihr Einfluss auf die Ossifikation der Matrix durch die Osteoblasten näher untersucht werden. Dazu sollten die T-Lymphozyten in ihre Sub-

populationen, zunächst CD4 positive T-Helferzellen und die CD8 positiven zytotoxischen T-Zellen, eingeteilt werden, um zu analysieren, ob der Effekt einer Subpopulation größer ausfällt. Des Weiteren können die T-Helferzellen in einzelne Untergruppen eingeteilt und auf ihren Einfluss getestet werden.

Ziel sollte es sein ein einzelnes Zytokin oder eine Kombination von Zytokinen zu finden, die entscheidend in die Differenzierung von osteoblastären Vorläufern und der anschließenden Ossifikation eingreifen um sie immunsuppremierten oder Patienten mit einer verzögerten oder einer ausbleibenden Frakturheilung zu applizieren und so eine erfolgreiche Heilung zu gewährleisten.

5 Literaturverzeichnis

1. Haas NP. [Callus modulation--fiction or reality?]. *Chirurg* 2000;71(9):987-8.
2. Heary RF, Schlenk RP, Sacchieri TA, Barone D, Brotea C. Persistent iliac crest donor site pain: independent outcome assessment. *Neurosurgery* 2002;50(3):510-6; discussion 516-7.
3. Banwart JC, Asher MA, Hassanein RS. Iliac crest bone graft harvest donor site morbidity. A statistical evaluation. *Spine (Phila Pa 1976)* 1995;20(9):1055-60.
4. Einhorn TA. The cell and molecular biology of fracture healing. *Clin Orthop Relat Res* 1998(355 Suppl):S7-21.
5. Datta HK, Ng WF, Walker JA, Tuck SP, Varanasi SS. The cell biology of bone metabolism. *J Clin Pathol* 2008;61(5):577-87.
6. Hofmann A, Mattyasovszky SG, Bruning C, Ritz U, Mehling I, Meurer A, Rommens PM. [Osteoblasts: Cellular and molecular regulatory mechanisms in fracture healing.]. *Orthopäde* 2009.
7. Raisz LG KB, Lorenzo JA, Larsen PR, Kronenberg HM, Melmed S, Polansky KS. Metabolic bone disease. In: Davies TF, Larsen PR, Kronenberg HM, eds. *Williams textbook of endocrinology*. Philadelphia: W.B. Saunders ; 13732002.
8. Junqueira LCU CJ, Gratzl M. *Histologie*. 6 ed: Springer-Lehrbuch; 2005.
9. JCJ W. A review of fracture healing. Volume 14: *Bone Biology*; 2000. p 457-463.
10. Takayanagi H. Osteoimmunology: shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems. *Nat Rev Immunol* 2007;7(4):292-304.
11. Karsenty G, Wagner EF. Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development. *Dev Cell* 2002;2(4):389-406.
12. David JP. Osteoimmunology: a view from the bone. *Adv Immunol* 2007;95:149-65.
13. Martin TJ SN, Quinn JMW. Interactions Among Osteoblasts, Osteoclasts, and Other Cells in Bone. In: Lorenzo JA, Choi Y, Horowitz M, Takayanagi H. *Osteoimmunology*; 2011.
14. Shapiro F. Bone development and its relation to fracture repair. The role of mesenchymal osteoblasts and surface osteoblasts. *Eur Cell Mater* 2008;15:53-76.
15. Teitelbaum SL. Bone resorption by osteoclasts. *Science* 2000;289(5484):1504-8.

16. Novack DV, Teitelbaum SL. The osteoclast: friend or foe? *Annu Rev Pathol* 2008;3:457-84.
17. AM P. Skeletal heterogeneity and the purpose of bone remodelling: implications for the understanding of osteoporosis. In: Marcus R, Feldman D, Kelsey J, editors. *Osteoporosis*. San Diego, CA: Academic Press; 1996. p p. 315-39.
18. Henriksen K, Leeming DJ, Byrjalsen I, Nielsen RH, Sorensen MG, Dziegiel MH, Martin TJ, Christiansen C, Qvist P, Karsdal MA. Osteoclasts prefer aged bone. *Osteoporos Int* 2007;18(6):751-9.
19. Henriksen K, Sørensen MG, Nielsen RH, Gram J, Schaller S, Dziegiel MH, Everts V, Bollerslev J, Karsdal MA. Degradation of the organic phase of bone by osteoclasts: a secondary role for lysosomal acidification. *J Bone Miner Res* 2006;21(1):58-66.
20. Chambers TJ, Darby JA, Fuller K. Mammalian collagenase predisposes bone surfaces to osteoclastic resorption. *Cell Tissue Res* 1985;241(3):671-5.
21. Kogianni G, Mann V, Noble BS. Apoptotic bodies convey activity capable of initiating osteoclastogenesis and localized bone destruction. *J Bone Miner Res* 2008;23(6):915-27.
22. Suzuki R, Domon T, Wakita M. Some osteocytes released from their lacunae are embedded again in the bone and not engulfed by osteoclasts during bone remodeling. *Anat Embryol (Berl)* 2000;202(2):119-28.
23. Hughes DE, Boyce BF. Apoptosis in bone physiology and disease. *Mol Pathol* 1997;50(3):132-7.
24. Nakamura T, Imai Y, Matsumoto T, Sato S, Takeuchi K, Igarashi K, Harada Y, Azuma Y, Krust A, Yamamoto Y and others. Estrogen prevents bone loss via estrogen receptor alpha and induction of Fas ligand in osteoclasts. *Cell* 2007;130(5):811-23.
25. Villanueva AR, Sypitkowski C, Parfitt AM. A new method for identification of cement lines in undecalcified, plastic embedded sections of bone. *Stain Technol* 1986;61(2):83-8.
26. Hynes RO. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 1992;69(1):11-25.
27. Dimitriou R, Tsiridis E, Carr I, Simpson H, Giannoudis PV. The role of inhibitory molecules in fracture healing. *Injury* 2006;37 Suppl 1:S20-9.
28. Carano R, Filvaroff E. Angiogenesis and bone repair. *Drug Discov Today* 2003;8(21):980-9.

29. Gustilo RB, Anderson JT. Prevention of infection in the treatment of one thousand and twenty-five open fractures of long bones: retrospective and prospective analyses. *J Bone Joint Surg Am* 1976;58(4):453-8.
30. Gerstenfeld LC, Cullinane DM, Barnes GL, Graves DT, Einhorn TA. Fracture healing as a post-natal developmental process: molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation. *J Cell Biochem* 2003;88(5):873-84.
31. Tsiridis E, Upadhyay N, Giannoudis P. Molecular aspects of fracture healing: which are the important molecules? *Injury* 2007;38 Suppl 1:S11-25.
32. Schindeler A, McDonald MM, Bokko P, Little DG. Bone remodeling during fracture repair: The cellular picture. *Semin Cell Dev Biol* 2008;19(5):459-66.
33. Gerber HP, Vu TH, Ryan AM, Kowalski J, Werb Z, Ferrara N. VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nat Med* 1999;5(6):623-8.
34. Marriott I. Osteoblast responses to bacterial pathogens: a previously unappreciated role for bone-forming cells in host defense and disease progression. *Immunol Res* 2004;30(3):291-308.
35. Marriott I, Gray DL, Rati DM, Fowler VG, Stryjewski ME, Levin LS, Hudson MC, Bost KL. Osteoblasts produce monocyte chemoattractant protein-1 in a murine model of *Staphylococcus aureus* osteomyelitis and infected human bone tissue. *Bone* 2005;37(4):504-12.
36. Di Rosa F, Pabst R. The bone marrow: a nest for migratory memory T cells. *Trends Immunol* 2005;26(7):360-6.
37. Fearon DT, Locksley RM. The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science* 1996;272(5258):50-3.
38. Janeway CA TP, Walport M, Shlomchik M. *Immunologie*. 5 ed: Spektrum Akademischer Verlag; 2002.
39. Abbas AK LA, Pillai S. *Cellular and Molecular Immunology*. 6 ed: Saunders W.B.; 2007.
40. Hesslein D, Aguila HL, Horowitz MC. The Adaptive Immune Response. In: Lorenzo J, Choi Y, Horowitz MC, Takayanagi H. *Osetoimmunology*: Academic Press; 2011.
41. Houston EG, Fink PJ. MHC drives TCR repertoire shaping, but not maturation, in recent thymic emigrants. *J Immunol* 2009;183(11):7244-9.

42. R A. A Breif Review of the Immune System. Volume 4. Primary Care: Clinics in Office Practice: W. B. Saunders Company; 1998.
43. Scotet E, Nedellec S, Devilder MC, Allain S, Bonneville M. Bridging innate and adaptive immunity through gammadelta T-dendritic cell crosstalk. *Front Biosci* 2008;13:6872-85.
44. Born WK, O'Brien RL. Antigen-restricted gammadelta T-cell receptors? *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2009;57(2):129-35.
45. Jameson J, Ugarte K, Chen N, Yachi P, Fuchs E, Boismenu R, Havran WL. A role for skin gammadelta T cells in wound repair. *Science* 2002;296(5568):747-9.
46. Mani RS, Chinnaiyan AM. Triggers for genomic rearrangements: insights into genomic, cellular and environmental influences. *Nat Rev Genet* 2010;11(12):819-29.
47. Rolink A, Melchers F. Molecular and cellular origins of B lymphocyte diversity. *Cell* 1991;66(6):1081-94.
48. Matthews AG, Oettinger MA. RAG: a recombinase diversified. *Nat Immunol* 2009;10(8):817-21.
49. Mombaerts P, Iacomini J, Johnson RS, Herrup K, Tonegawa S, Papaioannou VE. RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes. *Cell* 1992;68(5):869-77.
50. Shinkai Y, Rathbun G, Lam KP, Oltz EM, Stewart V, Mendelsohn M, Charron J, Datta M, Young F, Stall AM. RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell* 1992;68(5):855-67.
51. Chan AC, Smeets MF, Izon DJ. An in vivo functional genetic screen for suppressors of the Rag1^{-/-} T-cell defect. *Mol Immunol* 2008;45(3):682-9.
52. Spanopoulou E. Cellular and molecular analysis of lymphoid development using Rag-deficient mice. *Int Rev Immunol* 1996;13(4):257-88.
53. Alt FW, Rathbun G, Oltz E, Taccioli G, Shinkai Y. Function and control of recombination-activating gene activity. *Ann N Y Acad Sci* 1992;651:277-94.
54. Grundy MA, Sentman CL. Immunodeficient mice have elevated numbers of NK cells in non-lymphoid tissues. *Exp Cell Res* 2006;312(19):3920-6.
55. Cushman J, Lo J, Huang Z, Wasserfall C, Petitto JM. Neurobehavioral changes resulting from recombinase activation gene 1 deletion. *Clin Diagn Lab Immunol* 2003;10(1):13-8.

56. Chun JJ, Schatz DG, Oettinger MA, Jaenisch R, Baltimore D. The recombination activating gene-1 (RAG-1) transcript is present in the murine central nervous system. *Cell* 1991;64(1):189-200.
57. Fischer A. Primary immunodeficiency diseases: an experimental model for molecular medicine. *Lancet* 2001;357(9271):1863-9.
58. Sobacchi C, Marrella V, Rucci F, Vezzoni P, Villa A. RAG-dependent primary immunodeficiencies. *Hum Mutat* 2006;27(12):1174-84.
59. Huang H, Manton KG. Newborn screening for severe combined immunodeficiency (SCID): a review. *Front Biosci* 2005;10:1024-39.
60. de Villartay JP, Poinsignon C, de Chasseval R, Buck D, Le Guyader G, Villey I. Human and animal models of V(D)J recombination deficiency. *Curr Opin Immunol* 2003;15(5):592-8.
61. Villa A, Santagata S, Bozzi F, Imberti L, Notarangelo LD. Omenn syndrome: a disorder of Rag1 and Rag2 genes. *J Clin Immunol* 1999;19(2):87-97.
62. Rosen CJ, Ackert-Bicknell C, Rodriguez JP, Pino AM. Marrow fat and the bone microenvironment: developmental, functional, and pathological implications. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 2009;19(2):109-24.
63. Dewhirst FE, Stashenko PP, Mole JE, Tsurumachi T. Purification and partial sequence of human osteoclast-activating factor: identity with interleukin 1 beta. *J Immunol* 1985;135(4):2562-8.
64. Bertolini DR, Nedwin GE, Bringman TS, Smith DD, Mundy GR. Stimulation of bone resorption and inhibition of bone formation in vitro by human tumour necrosis factors. *Nature* 1986;319(6053):516-8.
65. Ishimi Y, Miyaura C, Jin CH, Akatsu T, Abe E, Nakamura Y, Yamaguchi A, Yoshiki S, Matsuda T, Hirano T. IL-6 is produced by osteoblasts and induces bone resorption. *J Immunol* 1990;145(10):3297-303.
66. Kong YY, Yoshida H, Sarosi I, Tan HL, Timms E, Capparelli C, Morony S, Oliveiras-Santos AJ, Van G, Itie A and others. OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature* 1999;397(6717):315-23.
67. Kim D, Mebius RE, MacMicking JD, Jung S, Cupedo T, Castellanos Y, Rho J, Wong BR, Josien R, Kim N and others. Regulation of peripheral lymph node genesis by the tumor necrosis factor family member TRANCE. *J Exp Med* 2000;192(10):1467-78.
68. Theill LE, Boyle WJ, Penninger JM. RANK-L and RANK: T cells, bone loss, and mammalian evolution. *Annu Rev Immunol* 2002;20:795-823.

69. Li Y, Toraldo G, Li A, Yang X, Zhang H, Qian WP, Weitzmann MN. B cells and T cells are critical for the preservation of bone homeostasis and attainment of peak bone mass in vivo. *Blood* 2007;109(9):3839-48.
70. Kotake S, Udagawa N, Hakoda M, Mogi M, Yano K, Tsuda E, Takahashi K, Furuya T, Ishiyama S, Kim KJ and others. Activated human T cells directly induce osteoclastogenesis from human monocytes: possible role of T cells in bone destruction in rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Rheum* 2001;44(5):1003-12.
71. Teng YT, Nguyen H, Gao X, Kong YY, Gorczynski RM, Singh B, Ellen RP, Penninger JM. Functional human T-cell immunity and osteoprotegerin ligand control alveolar bone destruction in periodontal infection. *J Clin Invest* 2000;106(6):R59-67.
72. Choi Y, Woo KM, Ko SH, Lee YJ, Park SJ, Kim HM, Kwon BS. Osteoclastogenesis is enhanced by activated B cells but suppressed by activated CD8(+) T cells. *Eur J Immunol* 2001;31(7):2179-88.
73. Toraldo G, Roggia C, Qian WP, Pacifici R, Weitzmann MN. IL-7 induces bone loss in vivo by induction of receptor activator of nuclear factor kappa B ligand and tumor necrosis factor alpha from T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100(1):125-30.
74. Rundle CH, Wang H, Yu H, Chadwick RB, Davis EI, Wergedal JE, Lau KH, Mohan S, Ryaby JT, Baylink DJ. Microarray analysis of gene expression during the inflammation and endochondral bone formation stages of rat femur fracture repair. *Bone* 2006;38(4):521-9.
75. Bastian O, Pillay J, Alblas J, Leenen L, Koenderman L, Blokhuis T. Systemic inflammation and fracture healing. *J Leukoc Biol* 2011;89(5):669-73.
76. Kon T, Cho TJ, Aizawa T, Yamazaki M, Nooh N, Graves D, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Expression of osteoprotegerin, receptor activator of NF-kappaB ligand (osteoprotegerin ligand) and related proinflammatory cytokines during fracture healing. *J Bone Miner Res* 2001;16(6):1004-14.
77. Park SH, Silva M, Bahk WJ, McKellop H, Lieberman JR. Effect of repeated irrigation and debridement on fracture healing in an animal model. *J Orthop Res* 2002;20(6):1197-204.
78. Einhorn TA, Majeska RJ, Rush EB, Levine PM, Horowitz MC. The expression of cytokine activity by fracture callus. *J Bone Miner Res* 1995;10(8):1272-81.
79. Barbul A, Breslin RJ, Woodyard JP, Wasserkrug HL, Efron G. The effect of in vivo T helper and T suppressor lymphocyte depletion on wound healing. *Ann Surg* 1989;209(4):479-83.
80. Vikulina T, Fan X, Yamaguchi M, Roser-Page S, Zayzafoon M, Guidot DM, Ofotokun I, Weitzmann MN. Alterations in the immuno-skeletal interface drive bone destruction in HIV-1 transgenic rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107(31):13848-53.

81. Bosma MJ, Carroll AM. The SCID mouse mutant: definition, characterization, and potential uses. *Annu Rev Immunol* 1991;9:323-50.
82. Michie AM, Zúñiga-Pflücker JC. Regulation of thymocyte differentiation: pre-TCR signals and beta-selection. *Semin Immunol* 2002;14(5):311-23.
83. Mombaerts P, Clarke AR, Rudnicki MA, Iacomini J, Itohara S, Lafaille JJ, Wang L, Ichikawa Y, Jaenisch R, Hooper ML. Mutations in T-cell antigen receptor genes alpha and beta block thymocyte development at different stages. *Nature* 1992;360(6401):225-31.
84. Nutt SL, Heavey B, Rolink AG, Busslinger M. Commitment to the B-lymphoid lineage depends on the transcription factor Pax5. *Nature* 1999;401(6753):556-62.
85. Terauchi M, Li JY, Bedi B, Baek KH, Tawfeek H, Galley S, Gilbert L, Nanes MS, Zayzafoon M, Guldberg R and others. T lymphocytes amplify the anabolic activity of parathyroid hormone through Wnt10b signaling. *Cell Metab* 2009;10(3):229-40.
86. Horowitz MC, Lorenzo JA. The origins of osteoclasts. *Curr Opin Rheumatol* 2004;16(4):464-8.
87. Takayanagi H. Osteoimmunology and the effects of the immune system on bone. *Nat Rev Rheumatol* 2009;5(12):667-76.
88. Murphy TJ, Ni Choileain N, Zang Y, Mannick JA, Lederer JA. CD4+CD25+ regulatory T cells control innate immune reactivity after injury. *J Immunol* 2005;174(5):2957-63.
89. Lange J, Sapozhnikova A, Lu C, Hu D, Li X, Miclau T, 3rd, Marcucio RS. Action of IL-1beta during fracture healing. *J Orthop Res*;28(6):778-84.
90. Manabe N, Kawaguchi H, Chikuda H, Miyaura C, Inada M, Nagai R, Nabeshima Y, Nakamura K, Sinclair AM, Scheuermann RH and others. Connection between B lymphocyte and osteoclast differentiation pathways. *J Immunol* 2001;167(5):2625-31.
91. Gao Y, Wu X, Terauchi M, Li J, Grassi F, Galley S, Yang X, Weitzmann M, Pacifici R. T cells potentiate PTH-induced cortical bone loss through CD40L signaling. *Cell Metab* 2008;8(2):132-45.
92. Won HY, Lee JA, Park ZS, Song JS, Kim HY, Jang SM, Yoo SE, Rhee Y, Hwang ES, Bae MA. Prominent bone loss mediated by RANKL and IL-17 produced by CD4+ T cells in TallyHo/JngJ mice. *PLoS One* 2011;6(3):e18168.
93. Dougall WC, Glaccum M, Charrier K, Rohrbach K, Brasel K, De Smedt T, Daro E, Smith J, Tometsko ME, Maliszewski CR and others. RANK is essential for osteoclast and lymph node development. *Genes Dev* 1999;13(18):2412-24.

94. Kong YY, Feige U, Sarosi I, Bolon B, Tafuri A, Morony S, Capparelli C, Li J, Elliott R, McCabe S and others. Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand. *Nature* 1999;402(6759):304-9.
95. Mizuno A, Amizuka N, Irie K, Murakami A, Fujise N, Kanno T, Sato Y, Nakagawa N, Yasuda H, Mochizuki S and others. Severe osteoporosis in mice lacking osteoclastogenesis inhibitory factor/osteoprotegerin. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;247(3):610-5.
96. Shelley O, Murphy T, Paterson H, Mannick JA, Lederer JA. Interaction between the innate and adaptive immune systems is required to survive sepsis and control inflammation after injury. *Shock* 2003;20(2):123-9.
97. Aizawa T, Kon T, Einhorn TA, Gerstenfeld LC. Induction of apoptosis in chondrocytes by tumor necrosis factor-alpha. *J Orthop Res* 2001;19(5):785-96.
98. Wallace A, Cooney TE, Englund R, Lubahn JD. Effects of interleukin-6 ablation on fracture healing in mice. *J Orthop Res* 2011;29(9):1437-42.
99. Izu Y, Sun M, Zwolanek D, Veit G, Williams V, Cha B, Jepsen KJ, Koch M, Birk DE. Type XII collagen regulates osteoblast polarity and communication during bone formation. *J Cell Biol* 2011;193(6):1115-30.
100. Rahkonen O, Su M, Hakovirta H, Koskivirta I, Hormuzdi SG, Vuorio E, Bornstein P, Penttinen R. Mice with a deletion in the first intron of the Col1a1 gene develop age-dependent aortic dissection and rupture. *Circ Res* 2004;94(1):83-90.
101. Lisse TS, Thiele F, Fuchs H, Hans W, Przemeck GK, Abe K, Rathkolb B, Quintanilla-Martinez L, Hoelzlwimmer G, Helfrich M and others. ER stress-mediated apoptosis in a new mouse model of osteogenesis imperfecta. *PLoS Genet* 2008;4(2):e7.
102. Schaffer M, Barbul A. Lymphocyte function in wound healing and following injury. *Br J Surg* 1998;85(4):444-60.
103. Schaffer M, Bongartz M, Hoffmann W, Viebahn R. MHC-class-II-deficiency impairs wound healing. *J Surg Res* 2007;138(1):100-5.
104. Colburn NT, Zaal KJ, Wang F, Tuan RS. A role for gamma/delta T cells in a mouse model of fracture healing. *Arthritis Rheum* 2009;60(6):1694-703.
105. Colnot C. Skeletal cell fate decisions within periosteum and bone marrow during bone regeneration. *J Bone Miner Res* 2009;24(2):274-82.
106. Ramasamy R, Fazekasova H, Lam EW, Soeiro I, Lombardi G, Dazzi F. Mesenchymal stem cells inhibit dendritic cell differentiation and function by preventing entry into the cell cycle. *Transplantation* 2007;83(1):71-6.

107. Spaggiari GM, Capobianco A, Abdelrazik H, Becchetti F, Mingari MC, Moretta L. Mesenchymal stem cells inhibit natural killer-cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2. *Blood* 2008;111(3):1327-33.
108. Zappia E, Casazza S, Pedemonte E, Benvenuto F, Bonanni I, Gerdoni E, Giunti D, Ceravolo A, Cazzanti F, Frassoni F and others. Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy. *Blood* 2005;106(5):1755-61.
109. Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, Milanesi M, Longoni PD, Matteucci P, Grisanti S, Gianni AM. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood* 2002;99(10):3838-43.
110. Kolar P, Schmidt-Bleek K, Schell H, Gaber T, Toben D, Schmidmaier G, Perka C, Buttgerit F, Duda GN. The early fracture hematoma and its potential role in fracture healing. *Tissue Eng Part B Rev* 2010;16(4):427-34.
111. Nakashima T, Takayanagi H. Osteoclasts and the immune system. *J Bone Miner Metab* 2009;27(5):519-29.
112. Frost A, Jonsson KB, Nilsson O, Ljunggren O. Inflammatory cytokines regulate proliferation of cultured human osteoblasts. *Acta Orthop Scand* 1997;68(2):91-6.
113. Cho TJ, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Differential temporal expression of members of the transforming growth factor beta superfamily during murine fracture healing. *J Bone Miner Res* 2002;17(3):513-20.
114. Olmedo ML, Landry PS, Sadasivan KK, Albright JA, Meek WD, Routh R, Marino AA. Regulation of osteoblast levels during bone healing. *J Orthop Trauma* 1999;13(5):356-62.
115. Roggia C, Gao Y, Cenci S, Weitzmann MN, Toraldo G, Isaia G, Pacifici R. Up-regulation of TNF-producing T cells in the bone marrow: a key mechanism by which estrogen deficiency induces bone loss in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98(24):13960-5.
116. Andrew JG, Andrew SM, Freemont AJ, Marsh DR. Inflammatory cells in normal human fracture healing. *Acta Orthop Scand* 1994;65(4):462-6.
117. Schmidt-Bleek K, Schell H, Kolar P, Pfaff M, Perka C, Buttgerit F, Duda G, Lienau J. Cellular composition of the initial fracture hematoma compared to a muscle hematoma: A study in sheep. *J Orthop Res* 2009.
118. Marusic A, Greevic D, Katavic V, Kovacic N, Lukic IK, Kalajzic I, Lorenzo JA. Role of B lymphocytes in new bone formation. *Lab Invest* 2000;80(11):1761-74.

119. Lienau J, Schmidt-Bleek K, Peters A, Weber H, Bail HJ, Duda GN, Perka C, Schell H. Insight into the molecular pathophysiology of delayed bone healing in a sheep model. *Tissue Eng Part A* 2010;16(1):191-9.
120. Santavirta S, Konttinen YT, Nordström D, Mäkelä A, Sorsa T, Hukkanen M, Rokkanen P. Immunologic studies of nonunited fractures. *Acta Orthop Scand* 1992;63(6):579-86.
121. Walsh MC, Kim N, Kadono Y, Rho J, Lee SY, Lorenzo J, Choi Y. Osteoimmunology: interplay between the immune system and bone metabolism. *Annu Rev Immunol* 2006;24:33-63.
122. Kotake S, Udagawa N, Takahashi N, Matsuzaki K, Itoh K, Ishiyama S, Saito S, Inoue K, Kamatani N, Gillespie MT and others. IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis. *J Clin Invest* 1999;103(9):1345-52.
123. Sato K, Suematsu A, Okamoto K, Yamaguchi A, Morishita Y, Kadono Y, Tanaka S, Kodama T, Akira S, Iwakura Y and others. Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction. *J Exp Med* 2006;203(12):2673-82.
124. Guo R, Yamashita M, Zhang Q, Zhou Q, Chen D, Reynolds DG, Awad HA, Yanoso L, Zhao L, Schwarz EM and others. Ubiquitin ligase Smurf1 mediates tumor necrosis factor-induced systemic bone loss by promoting proteasomal degradation of bone morphogenetic signaling proteins. *J Biol Chem* 2008;283(34):23084-92.
125. Mountziaris PM, Mikos AG. Modulation of the inflammatory response for enhanced bone tissue regeneration. *Tissue Eng Part B Rev* 2008;14(2):179-86.
126. Aspenberg P. Drugs and fracture repair. *Acta Orthop* 2005;76(6):741-8.
127. Grundnes O, Reikeraas O. Effects of macrophage activation on bone healing. *J Orthop Sci* 2000;5(3):243-7.
128. RJ B, G B, C C, G L, D M. Inflammation- a double edged sword in high-energy fractures? Volume 87 (Suppl. 3). *J Bone Joint Surg Br* 2005. p 265-266.
129. Reikeras O, Shegarfi H, Wang JE, Utvag SE. Lipopolysaccharide impairs fracture healing: an experimental study in rats. *Acta Orthop* 2005;76(6):749-53.
130. Grøgaard B, Gerdin B, Reikeras O. The polymorphonuclear leukocyte: has it a role in fracture healing? *Arch Orthop Trauma Surg* 1990;109(5):268-71.
131. Daniel T, Thobe BM, Chaudry IH, Choudhry MA, Hubbard WJ, Schwacha MG. Regulation of the postburn wound inflammatory response by gamma delta T-cells. *Shock* 2007;28(3):278-83.

132. Toth B, Alexander M, Daniel T, Chaudry IH, Hubbard WJ, Schwacha MG. The role of gammadelta T cells in the regulation of neutrophil-mediated tissue damage after thermal injury. *J Leukoc Biol* 2004;76(3):545-52.
133. Suzuki A, Iwamura C, Shinoda K, Tumes DJ, Kimura MY, Hosokawa H, Endo Y, Horiuchi S, Tokoyoda K, Koseki H and others. Polycomb group gene product Ring1B regulates Th2-driven airway inflammation through the inhibition of Bim-mediated apoptosis of effector Th2 cells in the lung. *J Immunol* 2010;184(8):4510-20.
134. Bot A. Immunoglobulin deficient mice generated by gene targeting as models for studying the immune response. *Int Rev Immunol* 1996;13(4):327-40.
135. Cenci S, Weitzmann MN, Roggia C, Namba N, Novack D, Woodring J, Pacifici R. Estrogen deficiency induces bone loss by enhancing T-cell production of TNF-alpha. *J Clin Invest* 2000;106(10):1229-37.
136. Henricson A, Hulth A, Johnell O. The occurrence of accessory immunologic cells in bone induction. *Clin Orthop Relat Res* 1991(264):270-7.
137. John V, Hock JM, Short LL, Glasebrook AL, Galvin RJ. A role for CD8+ T lymphocytes in osteoclast differentiation in vitro. *Endocrinology* 1996;137(6):2457-63.
138. Josien R, Wong BR, Li HL, Steinman RM, Choi Y. TRANCE, a TNF family member, is differentially expressed on T cell subsets and induces cytokine production in dendritic cells. *J Immunol* 1999;162(5):2562-8.
139. Di Rosa F. T-lymphocyte interaction with stromal, bone and hematopoietic cells in the bone marrow. *Immunol Cell Biol* 2009;87(1):20-9.
140. Beamer WG, Donahue LR, Rosen CJ, Baylink DJ. Genetic variability in adult bone density among inbred strains of mice. *Bone* 1996;18(5):397-403.
141. Kitamura D, Roes J, Kühn R, Rajewsky K. A B cell-deficient mouse by targeted disruption of the membrane exon of the immunoglobulin mu chain gene. *Nature* 1991;350(6317):423-6.
142. Shafritz AB, Shore EM, Gannon FH, Zasloff MA, Taub R, Muenke M, Kaplan FS. Overexpression of an osteogenic morphogen in fibrodysplasia ossificans progressiva. *N Engl J Med* 1996;335(8):555-61.
143. Gannon FH, Valentine BA, Shore EM, Zasloff MA, Kaplan FS. Acute lymphocytic infiltration in an extremely early lesion of fibrodysplasia ossificans progressiva. *Clin Orthop Relat Res* 1998(346):19-25.
144. Abbas AK, Murphy KM, Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 1996;383(6603):787-93.

145. Rammensee HG, Falk K, Rötzschke O. Peptides naturally presented by MHC class I molecules. *Annu Rev Immunol* 1993;11:213-44.
146. Grossman Z, Paul WE. Self-tolerance: context dependent tuning of T cell antigen recognition. *Semin Immunol* 2000;12(3):197-203; discussion 257-344.
147. Sakaguchi S, Sakaguchi N. Regulatory T cells in immunologic self-tolerance and autoimmune disease. *Int Rev Immunol* 2005;24(3-4):211-26.
148. Sezer O, Heider U, Zavrski I, Kühne CA, Hofbauer LC. RANK ligand and osteoprotegerin in myeloma bone disease. *Blood* 2003;101(6):2094-8.
149. Eghbali-Fatourehchi G, Khosla S, Sanyal A, Boyle WJ, Lacey DL, Riggs BL. Role of RANK ligand in mediating increased bone resorption in early postmenopausal women. *J Clin Invest* 2003;111(8):1221-30.

6 Anhang

6.1 Danksagungen

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Georg Duda, der mir die Möglichkeit gab , diese Doktorarbeit in seinem Institut anzufertigen. Ich danke Ihm für die kompetente Betreuung und Gesprächsbereitschaft bezüglich dieser Arbeit.

Ich möchte mich auch bei Prof. Dr. Andreas Radbruch bedanken, der mir in Gesprächen wertvolle Denkanstöße für dich Arbeit gab.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei Dr. Katharina Schmidt-Bleek für die Mitbetreuung der Arbeit, zahlreiche fachliche Gespräche und das Korrekturlesen dieser Arbeit. Bedanken möchte ich mich auch bei Dr. Agnes Ellinghaus, die freundlicherweise die Operation der Tiere übernommen hat. Dr. Hanna Schell danke ich für die wissenschaftlichen Diskussionen.

Norma Schulz, Gabriela Korus und Marzena Princ danke ich für die vielseitige Hilfe im Labor.

Ein herzliches Dankeschön auch an Thaqif ElKhassawna mit dem ich während der gesamten Doktorarbeitszeit eng zusammengearbeitet habe.

Mein tiefer Dank gilt meinen Eltern und meiner gesamten Familie, die mich unterstützen und auf die ich mich immer verlassen kann. Ohne euch wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

6.2 Veröffentlichungen und Kongressbeiträge

Kongressbeiträge

Toben D, **Schroeder I**, El Khassawna T, Mehta M, Hoffmann J, Frisch J, Schell H, Lienau J, Serra A, Radbruch A, Duda GN, Fracture Healing is Accelerated in the Absence of the Adaptive Immune System., *31st Annual Meeting of the American Society of Bone and Mineral Research*, 11.-15. Sept. 2009, Denver (Poster)

Schroeder I, El Khassawna T, Metha M, Hoffmann J, Frisch J, Schell H, Lienau J, Serra A, Radbruch A, Duda GN, Toben D., Fracture Healing is Accelerated in the Absence of the Adaptive Immune System., *20th European Student's Conference*, 4.-7. Okt. 2009, Berlin (Vortrag)

Schroeder I, Lienau J, El Khassawna T, Serra A, Radbruch A, Duda GN, Toben D., Beschleunigte Frakturheilung bei Lymphozytendefizienz., *Osteologie Kongress 2010*, 3.-6. Mrz. 2010, Berlin (Vortrag)

Toben D, Serra A, **Schroeder I**, El Khassawna T, Rugpolmuang L, Mehta M, Hoffmann JE, Schill A, Frisch J, Schell H, Lienau J, Radbruch A, Duda GN., Selective Depletion of Macrophages Delays Fracture Healing., *56th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society*, 6.-9. Mrz. 2010, New Orleans (Poster)

Toben D, **Schroeder I**, El Khassawna T, Mehta M, Hoffmann JE, Frisch J, Schell H, Lienau J, Serra A, Radbruch A, Duda GN., Fracture Healing is Accelerated in the Absence of the Adaptive Immune System., *Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society*, 6.-9. Mrz. 2010, New Orleans (Poster)

Schroeder I, el Khassawna T, Lienau j, Schell H, Serra A, Radbruch A, Duda GN, Toben D., Enhanced fracture healing in RAG1^{-/-} mice., *3rd International Conference on Osteoimmunology: Interactions of the Immune and Skeletal Systems*, 20.-25. Jun. 2010, Fira, Santorini (Poster)

Toben D, **Schröder I**, El Khassawna T, Schell H, Lienau J, Duda GN., Beschleunigte Frakturheilung bei Lymphozytendefizienz., *Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie*, 26.-29. Okt. 2010, Berlin (Vortrag)

Schroeder I, El Khassawna T, Schmidt-Bleek K, Schell H, Serra A, Radbruch A, Duda GN, Toben D., Fracture healing in a RAG1^{-/-} mouse model., *BSRT PhD Symposium. Stem Cells: Hopes, Fears and reality*, 1.-3. Dez. 2010, Berlin (Poster/Vortrag)

Schroeder I, El Khassawna T, Schmidt-Bleek K, Schell H, Serra A, Radbruch A, Duda GN, Toben D., Fracture healing without adaptive immunity., *7th Spring School on Immunology 2011*, 13.-18. Mrz. 2011, Ettal (Poster)

Schroeder I, El Khassawna T, Schmidt-Bleek K, Schell H, Serra A, Radbruch A, Duda GN, Toben D., Inflammation und Frakturheilung., *Osteologie Kongress 2011*, 24.-26. Mrz. 2011, Fürth (Vortrag)

Veröffentlichungen

Toben D, **Schroeder I**, El Khassawna T, Mehta M, Hoffmann JE, Frisch JT, Schell H, Lienau J, Serra A, Radbruch A, Duda GN. Fracture healing is accelerated in the absence of the adaptive immune system. *J Bone Miner Res.* 2011 Jan;26(1):113-24.

Preise

Posterpreis 3rd International Conference on Osteoimmunology: Interactions of the Immune and Skeletal Systems

Travel Award der BSRT für 3rd International Conference on Osteoimmunology: Interactions of the Immune and Skeletal Systems 2010 und 7th Spring School on Immunology 2011

6.3 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Ireen Könnecke, die hier vorliegende Dissertation selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfen und Literaturquellen angefertigt zu haben.

Ich habe mich an keiner anderen Universität um einen Doktorgrad beworben und besitze keinen entsprechenden.

Ich habe die dem Verfahren zugrunde liegende Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Humboldt-Universität zu Berlin zu Kenntnis genommen.

Berlin den, _____

Ireen Könnecke